Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. L. Koslowski

Das Verhalten von Bilirubin, Serotonin, Monoaminooxidase, Adenosin-5'-Phosphaten, 2,3-DPG, Albumin, γ-Globulin, IgM, Zn, Mg und Cu im Kaninchenblut nach tierexperimenteller Verbrühung bei 90° C

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von

Jan-Willem Krüger
aus Enschede

1986

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543903_0111

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. L. Koslowski

Das Verhalten von Bilirubin, Serotonin, Monoaminooxidase, Adenosin-5'-Phosphaten, 2,3-DPG, Albumin, γ-Globulin, Ig M, Zn, Mg und Cu im Kaninchenblut nach tierexperimenteller Verbrühung bei 90° C

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von

Jan-Willem Krüger
aus Enschede

1986

Dekan:	Professor Dr. W. Schulte
1. Berichterstatter:	Professor Dr. R. Hettich
2. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. J. Bohner

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45

Inhaltsübersicht

1.1. Einleitung 1
1.2. Pathophysiologie der Verbrennungskrankheit 2
1.3. Aufgabenstellung 3
1.4. Blutparameter
1.4.1. Bilirubin 4
1.4.2. Serotonin 4
1.4.3. Plasmamonoaminooxidase 5
1.4.4. Organische Phosphate
1.4.4.1. Adenosin-5'-Phosphate 6
1.4.4.2. 2,3-Diphosphoglycerat 7
1.4.5. Elektrolyte
1.4.5.1. Zink 8
1.4.5.2. Magnesium 9
1.4.5.3. Kupfer 9
1.4.6. Plasmaproteine
1.4.6.1. Albumin 10
1.4.6.2. Gamma-Globuline 10

2. Material und Methoden
2.1. Versuchstiere 12
2.2. Verbrühung
2.2.1. Versuchsdurchführung 12
2.2.2. Bestimmung der verbrühten Körperoberfläche 13
2.3. Aufarbeitung und Lagerung der Blutproben 14
2.4. Bestimmungsmethoden
2.4.1. Bestimmung der Plasmamonoaminooxidase
2.4.1.1. Einleitung 14
2.4.1.2. Benutzte Materialien 15
2.4.1.3. Bestimmung 15
2.4.1.4. Eichkurven 16
2.4.1.5. Berechnung der Enzymaktivität 16
2.4.2. Bestimmung des Serotonins
2.4.2.1. Einleitung 17
2.4.2.2. Benutzte Materialien 17
2.4.2.3. Bestimmung 18
2.4.3.4. Eichkurve 19

2.4.2.5. Bestimmung der Serotoninkonzentration 19
2.4.3. Bestimmung des Gesamtbilirubins
2.4.3.1. Einleitung 20
2.4.3.2. Benutzte Materialien 20
2.4.3.3. Bestimmung 20
2.4.3.4. Qualitätskontrolle 21
2.4.4. Bestimmung der organischen Phosphate
2.4.4.1. Bestimmung des Adenosin-5'-triphosphats (ATP)
2.4.4.1.1. Einleitung 21
2.4.4.1.2. Benutzte Materialien 21
2.4.4.1.3. Bestimmung 22
2.4.4.2. Bestimmung des Adenosin-5'-diphosphats (ADP) und des Adenosin-5'-monophosphats (AMP)
2.4.4.2.1. Einleitung 22
2.4.4.2.2. Benutzte Materialien 22
2.4.4.2.3. Bestimmung 22
2.4.4.3. Bestimmung des 2,3-Diphosphoglycerats (2,3-DPG)
2.4.4.3.1. Einleitung 23
2.4.4.3.2. Benutzte Materialien 23
2.4.4.3.3. Bestimmung 23
2.4.5. Bestimmung von Magnesium, Zink, Kupfer
2.4.5.1. Einleitung 24
2.4.5.2. Benutzte Materialien 24
2.4.5.3. Bestimmung 24
2.4.5.4. Qualitätskontrolle 25
2.4.6. Quantitative immunologische Proteinbestimmung
2.4.6.1. Grundlagen der Laser-Nephelometrie 25
2.4.6.2. Benutzte Materialien 26
2.4.6.3. Allgemeine Durchführung der Bestimmungen 27
2.4.6.4. Eichkurven für: Albumin, Gamma-Globulin, Ig M 27
2.4.6.5. Bestimmung 28

3. Ergebnisse 29
3.1. Bilirubin 30
3.2. Serotonin 31
3.3. Monoaminooxidase
3.3.1. pH 6 32
3.3.2. pH 8 33

3.4. Organische Phosphate
3.4.1. Adenosin-5'-Phosphate 34
3.4.2. Energy Charge 37
3.4.3. 2,3-Diphosphoglycerat 38
3.5. Elektrolyte
3.5.1. Zink 39
3.5.2. Magnesium 40
3.5.3. Kupfer 41
3.6. Proteine
3.6.1. Albumin 42
3.6.2. Gamma-Globuline 43
3.6.3. Immunglobulin M 44

4. Diskussion der Ergebnisse 45
4.1. Gesamtbilirubin 45
4.2. Serotonin 45
4.3. Monoaminooxidase 46
4.4. Organische Phosphate
4.4.1. Adenosin-5'-Phosphate 46
4.4.2. 2,3-Diphosphoglycerat 47
4.5. Elektrolyte
4.5.1. Zink 47
4.5.2. Magnesium 47
4.5.3. Kupfer 48
4.6. Plasmaproteine
4.6.1. Albumin 48
4.6.2. Gamma-Globuline 49

5. Zusammenfassung und Diskussion 50

6. Tabellarischer Anhang 51

7. Literaturverzeichnis 58

1.1. Einleitung

Durch die Zunahme von Unfällen im Beruf und im Haushalt ist die Zahl der größeren Verbrennungen mit mehr als 20 % der Körperoberfläche oder mehr als 10 % der Körperoberfläche bei drittgradiger Verbrennung in den letzten Dezennien auch in der Bundesrepublik Deutschland weiter gestiegen. (Könn und Brandt, 1974) Hierbei sind folgende 4 Gruppen von Umweltfaktoren für die Haut- und Gewebsveränderungen verantwortlich:

1. Verbrennungen
2. Einwirkung chemischer Substanzen
3. Elektrizität
4. Heiße Flüssigkeiten,

wobei die morphologischen Schäden und pathologischen Veränderungen in den vorgenannten Gruppen unterschiedlich sein können. Obwohl es gelungen ist, die Überlebenszeit nach schweren Verbrennungen durch moderne Therapieformen zu verlängern, konnte die Letalität nicht entscheidend gesenkt werden und ist immer noch erschreckend hoch. (Könn und Brandt, 1974; Koslowski, 1963)

Die Mortalität nimmt mit der Fläche und der Tiefe der verbrannten Haut zu, unter Berücksichtigung einer Inhalationsverletzung und ist abhängig vom Alter des Patienten und dessen vorherigem Gesundheitszustand (Begleiterkrankungen), wobei Kinder unter 5 Jahren und Erwachsene über 60 Jahren eine schlechtere Prognose aufweisen. (Pruitt et al., 1964)

Während früher die meisten Patienten infolge des Verbrennungsschocks starben, ist heute eine schwere Allgemeininfektion die häufigste Todesursache, gefolgt von Bronchopneumonie und dem Verbrennungsschock. (Könn und Brandt, 1974; Koslowski, 1963; Sevitt, 1979)

Für die Infektionen sind oft die für den Menschen wenig virulenten Mikroorganismen verantwortlich, die auf einen durch die Verbrennung völlig erschöpften Organismus treffen. (Koslowski, 1963)

Durch die Verlängerung der Überlebenszeit, auch nach schwersten Schädigungen, wurde deutlich, daß die pathophysiologischen Störungen mit einer gewissen Gesetzmäßigkeit ablaufen, was zu dem Begriff der "Verbrennungskrankheit" geführt hat. (Koslowski, 1970)

Die vorliegende Arbeit will nun auf Grund einiger biochemischer Parameter, die den Begriff der Verbrennungskrankheit charakterisieren, zu einer Optimierung der bisherigen Therapie beitragen.

1.2. Pathophysiologie der Verbrennungskrankheit

Nach einer schweren thermischen Schädigung der Haut - hier sind heiße, kurz einwirkende Flüssigkeiten verwendet worden, die zweitgradige, Flammen dagegen drittgradige thermische Verletzungen hervorrufen - entsteht durch eine sofortige Ausschüttung von Histamin, gefolgt von länger ödemfördernden Faktoren wie Serotonin, Kininen etc. eine Permeabilitätsstörung, die, obwohl sie im geschädigten Gewebe besonders ausgeprägt ist, den gesamten Organismus befällt. Dabei werden die Gefäße für Proteine mit einer Molekülgröße von über 150000 Dalton durchlässig, woraus ein Protein-, Wasser- und Salzverlust durch Exsudation aus der geschädigten Haut und durch Ödembildung resultiert. (Koslowski, 1970; Sevitt, 1979) Diese Schockphase dauert ungefähr 2 Tage; nach 24 Stunden beginnt jedoch bereits die Rückresorption des Verbrennungsödems. (Saur et al., 1976)

Die Schockperiode kann Ursache für verschiedene Komplikationen sein, zB.: Hypovolämie, Mikrozirkulationsstörungen mit Gewebshypoxydose, schwere metabolische Störungen, eine bis zum 30-fachen erhöhte Katecholaminausschüttung, welche zur Kreislaufzentralisation führt, wobei das Herzminutenvolumen sowie der Sauerstoffpartialdruck im Gewebe drastisch abnehmen. Weitere Komplikationen sind Herzversagen, Anämie, Hämoglobinämie, hämolytischer Ikterus, Lungenödem, Nierenversagen u.v.m.. (Sevitt, 1979)

Nach schweren Verbrennungen zeigt sich eine extreme Steigerung des Energiestoffwechsels, die zu einem Abbau des Kohlenhydrat-, Fett- und Proteinbestandes führt. (Koslowski, 1970)

Im weiteren Verlauf der Verbrennungskrankheit kann es oft zu einem letalen Ausgang kommen, dem zwei entscheidende Ursachen zugrunde liegen: Einmal sind es die Spätfolgen der irreversibelen Organschäden durch die Schocksituation, die wohl auf die Störung der Mikrozirkulation in der Schockphase zurückzuführen sind, sodann kann es zu schweren Allgemeininfektionen kommen, da der erschöpfte Organismus wegen seines gestörten Immunsystems und großer offener Wundflächen die Ausbreitung der oft gegen Antibiotika resistenten Erreger nicht mehr verhindern kann. Unter den häufigsten letalen Ausgängen finden sich die durch Pseudomonas aeruginosa bedingten Pneumonien, die bakterielle Endocarditis, sowie massive Nebennierenblutungen.

1.3. Aufgabenstellung

Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es, die bekannten Methoden für die Messung einiger Blutparameter auf deren Verwendbarkeit beim Kaninchen zu überprüfen und das Verhalten dieser Parameter nach einer standardisierten experimentellen Verbrühung von ca. 25 % der Körperoberfläche zu beobachten.

Sinn dieser Beobachtung ist es, zu erkennen, welche dieser Parameter aufgrund solcher Laboruntersuchungen typische Veränderungen unter der Auswirkung des Verbrennungsschocks zeigen. Es soll späteren Untersuchungen anheimgestellt bleiben, spezielle Zusammenhänge dieser laborchemischen Veränderungen zu analysieren und mögliche Einflüsse einer Therapie aufzuzeigen. Bei den Experimenten wird der schockverstärkende, rein hämodynamische Effekt einer zusätzlich durch die Blutentnahmen bedingten Hypovolämie bewußt in Kauf genommen.

Folgende Blutparameter sind Gegenstand dieser Ausführung:

- -Bilirubin
- -Serotonin
- -Monoaminooxidase
- -Adenosin-5'-phosphate
- -2,3-Diphosphoglycerat
- -Albumin
- -Gamma-Globulin
- -Immunglobulin M
- -Zink
- -Magnesium
- -Kupfer

Die obengenannten Parameter spiegeln auf der einen Seite den gesteigerten Grundumsatz mit dem Verbrauch wichtiger Enzyme und den dazu benötigten Spurenelementen, den Verlust an Plasmaeiweißen und den Untergang lebensnotwendiger Blutzellbestandteile wieder.

1.4. Blutparameter

Biochemie und Pathobiochemie der bestimmten Blutparameter:

1.4.1. Bilirubin

Bilirubin entsteht aus dem enzymatischen Abbau von Hämoglobin und auch anderer Hämoproteine in den reticuloendothelialen Zellen der Leber, der Milz und des Knochenmarks (RES).

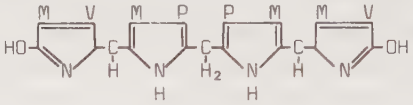


Abb. 1: Bilirubin

Das außerhalb der Leber entstandene freie Bilirubin (indirektes B) wird an Albumin gebunden und von der Leber aufgenommen, wo es wie das direkte Bilirubin glucuronidiert und durch die Galle ausgeschieden wird. (enterohepatischer Kreislauf)

Zustände mit einem erhöhten Zerfall von Erythrozyten, wie z.B. eine sekundäre Anämie nach schweren Verbrennungen, führen zu einer gesteigerten Bildung der Häm-Abbauprodukte. Es kommt zu einer Hyperbilirubinämie, wobei das nicht gekoppelte Bilirubin im Blut vermehrt ist (Sevitt, 1979) und zu einer erheblichen Schwächung des RES. (Loegering, 1981)

1.4.2. Serotonin

Serotonin, (5-Hydroxytryptamin; 5-HT) ein biogenes Amin, wird in den enterochromaffinen Zellen des Magen - Darm Traktes und im Zentralnervensystem aus L-Tryptophan synthetisiert. Es wird durch die mitochondriale Monoaminooxidase zum entsprechenden Aldehyd abgebaut, welches nach Dehydrierung in den Urin ausgeschieden wird.

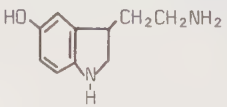


Abb. 2: 5-Hydroxytryptamin

Im Blut ist das Serotonin fast ausschließlich in den Granula der Thrombozyten lokalisiert. Die Aufnahme erfolgt aktiv, analog dem Membrantransport in 5-HT-Neuronen, da den Blutplättchen die zur Synthese nötigen Enzyme fehlen. (Gonzales, 1980)

In seiner Eigenschaft als neurohumorale Überträgersubstanz, ist es an einer Vielzahl von Reaktionen beteiligt. So übt es u.a. im ZNS Einfluß auf die Thermoregulation, zentrale endokrine Funktionen, zirkadianische Rhythmik und den Schlaf aus.

Das aus zerfallenen Thrombozyten freigesetzte Serotonin scheint an der Oligurie nach Verbrennungen beteiligt zu sein. Im Tierversuch zeigt es einen deutlichen antidiuretischen Effekt. (Geißler und Mutschler, 1977)

Serotonininfusionen bewirken beim Kaninchen eine deutliche Zunahme der Durchblutung (Vasodilatation) im Gehirn und Herz , auf Kosten der Blutversorgung (Vasokonstriktion) von Nieren , Haut, Leber und Lungen. (Saxena et al., 1978)

Beim malignen Carcinoid , einem Tumor der enterochromaffinen Zellen des Darmes, findet sich eine exzessive Steigerung der Synthese und Freisetzung von Serotonin. Leitsymptom ist eine anfallsweise auftretende Rötung der Haut , die durch die venöse Konstriktion mit daraus folgendem Blutstau in die passiv dilatierten Hautgefäße entsteht . (Geißler und Mutschler, 1977)

1.4.3. Plasmamonoaminooxidase (PMAO)

Das Enzym Monoaminooxidase ist, außer in den Mitochondrien verschiedener Gewebe , auch im Plasma des Menschen und vieler Säugetiere nachweisbar. Es katalysiert eine oxidative Desaminierung . Dabei werden die Amine zu Iminen dehydriert , deren hydrolytische Spaltung die entsprechenden Aldehyde und Ammoniak ergibt. (Mc Ewen, 1965)

$$RCH_2NH_2 + O_2 + H_2O \xrightarrow{MAO} RCHO + H_2O_2 + NH_3$$

Abb. 3: R-Amin R-Aldehyd Ammoniak

Die Monoaminooxidase im menschlichen Plasma ist in vielen Eigenschaften der MAO im Plasma niederer Säugetiere ähnlich. Diese zirkulierenden Enzyme desaminieren nur primäre Amine. Einfache aliphatische Monoamine, vorzugsweise mit langen Ketten , bilden die am schnellsten umgesetzten Substrate. Sekundäre-, tertiäre-Amine und Aminosäuren werden nicht angegriffen. (Mc Ewen, 1965)

Obwohl in vielen Eigenschaften der menschlichen PMAO ähnlich, besitzt das Enzym des Kaninchens eine etwas abweichende Substratspezifität. Am besten umgesetzt werden die Derivate des Phenyläthylamins, d.h. biogene Amine (Dopamin , Tyramin , Mescalin) und die C-Arylmethylamine; weniger schnell oxidiert werden Tryptamin, Serotonin, Histamin und einfache aliphatische Amine. Beim Menschen erfolgt der Serotoninabbau ausschließlich durch die mitochondriale Monoaminooxidase. (Mc Ewen, 1965)

Die PMAO kann durch eine hohe Substratkonzentration inhibiert werden. (Mc Ewen, 1965)

Der Entzug von Kupfer führt zu einem Aktivitätsverlust der PMAO, da es höchstwahrscheinlich ein Metallo - Enzym ist. (Mc Ewen et al., 1966; Yamada und Yasunobu, 1962)

Das Enzym des Kaninchens besitzt zwei pH - Optima; bei pH 6 und pH 8. Die biphasische pH - Kurve und eine unterschiedliche Inhibierung durch Kupferentzug , lassen auf ein Vorhandensein von 2 Isoenzymen schließen. (Arai et al., 1980) Es wurde deshalb beschlossen, die PMAO-Aktivität bei beiden pH-Werten zu messen.

Nach Verbrennungen kommt es zu einem drastischen Aktivitätsverlust der PMAO. (Lewinsohn, 1977)

1.4.4. Organische Phosphate

1.4.4.1. Adenosin-5'-Phosphate

Adenosin-5'-triphosphat (ATP), ein energiereiches organisches Phosphat, entsteht im Blut durch Substratkettenphosphorylierung in den Erythrozyten aus Adenosin-5'-diphosphat. 90 - 95 % der aufgenommenen Glucose, die die wesentliche Energiequelle des Erythrozyten ist, wird in der Glycolyse zur Bildung von ATP verwendet . Diese in Form von ATP gespeicherte Energie wird für den aktiven Ionentransport (K/Na-Pumpe) und zur Handhabung der Form der Erythrozyten benötigt. (Petrides et al., 1979)

Der Energy Charge, (ATP + 0,5 ADP):(ATP + ADP + AMP), ist das Verhältnis der einzelnen Adenosin-5'-phosphate untereinander und ist ein Maß für die vorhandene Energie. (Jope und Blass, 1975)

ATP senkt, jedoch in geringerem Maße wie 2,3 - DPG, die Affinität des Hämoglobins zum Sauerstoff. (Chanutin und Curnish, 1967)

Bei Schockzuständen wird der Energievorrat der Erythrozyten in Form von ATP erschöpft , was zu einem Versagen des aktiven Ionentransports

führt. (Schumer und Kukral, 1968) Das Kalium kann die Zellen verlassen, Natrium und Wasser dringen ein, wodurch die Erythrozyten ihre Form verlieren.

1.4.4.2. 2,3-Diphosphoglycerat

Erythrozyten des Menschen und der meisten Säugetiere enthalten im Gegensatz zu anderen Körperzellen 2,3 - Diphosphoglycerat (2,3-DPG) in einer hohen Konzentration, (Rapoport und Guest, 1941) die ungefähr der Molarität des Hämoglobins entspricht. (Benesch und Benesch, 1969)

Das 2,3 - DPG, ein energiereiches Phosphat, wird in den Erythrozyten auf einem Nebenweg der Glycolyse synthetisiert und auch abgebaut. Dabei wird ein Teil (etwa 20 %) des 1,3-Diphosphoglycerats durch die 2,3-DPG Mutase in das 2,3-DPG überführt, der Rest wird zu 3-Phosphoglycerat unter ATP-Bildung abgebaut. Der Abbau und die Rückkehr zur Glycolyse des 2,3-DPG zum 3-Phosphoglycerat (3-PG), erfolgt durch das Enzym 2,3-DPG-Phosphatase. (Rose, 1980) Der Anteil des Nebenweges im Abbau von 1,3-Diphosphoglycerat (1,3-DPG) zum 3-PG kann bei einer gesteigerten metabolischen Aktivität bis auf etwa 60 % zunehmen. Da dabei kein ATP gebildet wird, kann der Nebenweg auch als Energiepuffer angesehen werden. (Quadflieg und Brand, 1978)

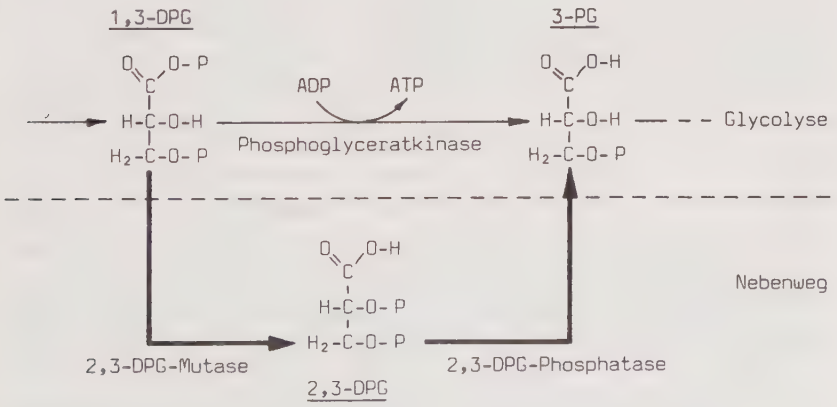


Abb. 4: 2,3-DPG-Nebenweg im Erythrozyten

Das 2,3 - Diphosphoglycerat, das sich an die β- Ketten von Hämoglobin bindet, wirkt am Hämoglobin als allosterischer Effektor, wodurch die Affinität zu Sauerstoff reduziert wird. (Perutz, 1970) Die Dissoziationskurve des Oxyhämoglobins wird nach rechts verschoben und so die Sauerstoffabgabe in der periferen Zirkulation erleichtert. (Chanutin und Curnish, 1967; Benesch und Benesch, 1969)

Der 2,3 - DPG-Gehalt wird durch den Oxygenierungsgrad des Hämoglobins im Erythrozyten geregelt. (Benesch und Benesch, 1969) Die Erythrozyten besitzen so die Möglichkeit zur Aufrechterhaltung der Sauerstoffversorgung der Gewebe unter verschiedenen ungünstigen Bedingungen: z.B. zur Anpassung an hypoxische Zustände (Anämien, Lungenkrankheiten, Höhenanpassung) durch Erhöhung der 2,3-DPG-Konzentration. (Dietsch und Siegmund, 1977)

1.4.5. Elektrolyte: Zink, Magnesium und Kupfer

1.4.5.1. Zink (Zn)

Die Resorption des essentiellen Bioelements Zink (Zn) erfolgt im Duodenum. 22 % des Zinks im Blut sind an Plasmaproteine gebunden, 75 % befinden sich in den Erythrozyten, der Rest in den Leukozyten. Es ist in den Enzymen Carboanhydrase, Pankreas-, Carboxypeptidase, Alkohol-, Glutamat-, Malat-, Lactatdehydrogenase und alkalische Phosphatase enthalten. Zink aktiviert Arginase, Enolase und verschiedene Peptidasen, es stabilisiert biologische Membranen und katalysiert die Biosynthese von Proteinen und Nucleinsäuren. (Petrides et al., 1979)

Bei tierexperimentellem Zn - Defizit kommt es zu vielen Mangelkrankheiten und zu teratologischen Schäden. (Dorn und Günther, 1970; Cohen und Schechter, 1973) So führt ein Zinkmangel insbesondere beim Kaninchen zu Wachstumshemmung, Gewichtsverlust, Haltungsanomalien, partiellem Haarausfall und zur Verschorfung der Haut und zu strukturellen Änderungen der Mundschleimhaut (Parakeratosis). (Joseph et al., 1981)

Die Heilung von Wunden ist bei Zn - defizienten Ratten deutlich verschlechtert. (Oberleas et al., 1971; Sandstead et al., 1970; Dietrich et al., 1974)

In der Schockphase der Verbrennungskrankheit ist der Zn-Plasmaspiegel infolge Zellzerstörung zunächst erhöht, sinkt danach jedoch progressiv durch Ausscheidung mit dem Wundsekret, wiedereinsetzende Diurese und Hautabstoßung. (Dietrich et al., 1974; Domres et al., 1977; Mountokala-

kis et al., 1980)

Da Zn an Eiweiße gebunden ist, muß der Zn-Verlust auch mit der Verminderung der Plasmaproteine in Verbindung gebracht werden. (Dietrich et al., 1974)

1.4.5.2. Magnesium (Mg)

Magnesium, ein weiteres essentielles Bioelement, wird im Dünndarm aufgenommen. Im Blutplasma befindet sich nur ein geringer Teil des Magnesiums, davon sind 32 % proteingebunden, 55 % ionisiert und 7 % komplexiert. 95 % des Gesamtbestandes befindet sich intrazellulär, wo es bei vielen Reaktionen eine große Bedeutung hat. Es dient bei allen ATP-umsetzenden Reaktionen als Komplexformer für ATP und ADP. Mg ist an der Protein- und Nucleinsäurebiosynthese beteiligt und antagoniert die Ca-abhängige Acetylcholinfreisetzung an der motorischen Endplatte. (Petrides et al., 1979)

Ein Magnesiummangel äußert sich klinisch in neuromuskulären Erscheinungen, wie z.B. vorübergehende multifokale oder generalisierte Anfälle, eine erhöhte neuromuskuläre Reizbarkeit, Hyperreflexie und Tachykardie. (Gerst et al., 1964)

Nach Verbrennungen zeigt das Magnesium im Plasma ein dem Zink analoges Verhalten. Da die intrazelluläre Mg-Konzentration in den Erythrozyten wesentlich höher ist als im Plasma, kommt es durch Zellbeschädigung zu einem erhöhten Plasmaspiegel des Magnesiums. Durch vermehrte renale Exkretion, Verluste ins Wundgebiet und Demarkation der verbrannten Haut entwickelt sich danach eine länger anhaltende Hypomagnesämie (Domres et al., 1977).

1.4.5.3. Kupfer (Cu)

Über die Darmmucosa aufgenommen, wird Kupfer im Portalblut locker an das Plasma-Albumin gebunden. Das zentrale Organ des Kupferstoffwechsels ist die Leber, wo das Kupfer gespeichert, oder in Metallo-Enzyme eingebaut wird. Die meisten kupferhaltigen Enzyme sind Oxidasen mit [Cu(II)] und hohen Redoxpotentialen, z.B.: Cytochrom-C-Oxidase, Monoaminooxidase, Tyrosinase, Katalase, Lysyloxidase und Ferrioxidase (Caeruloplasmin).

Bei Kupfermangel kann es unter anderem zu Störungen des Bindegewebsstoffwechsels (Enzym: Lysyloxidase) und zu Anämien (Enzym: Ferrioxidase

I) kommen. (Petrides et al., 1979)

1.4.6. Plasmaproteine

1.4.6.1. Albumin

Die Biosynthese des Albumins erfolgt in den Hepatozyten der Leber über die Vorstufe Proalbumin. Vom gesamten Albumin befinden sich etwa 40 % im Blutplasma. Die wichtigsten Aufgaben, die es dort erfüllt, sind die Regelung des onkotischen Drucks, an dem es durch seine hohe Wasserbindungsfähigkeit einen Anteil von 80 % hat. (Goodwin et al., 1981) und die Transportfunktion von z.B. Fettsäuren, Pharmaka, Vitaminen, Kationen (Ca, Cu, Mg, Zn), Spurenelementen und Abbauprodukten (Bilirubin).

Nach Verbrennungen werden die Gefäße in den geschädigten Gebieten für Proteine mit einer Molekülgröße von über 150000 Dalton durchlässig (Koslowski, 1970), wobei offensichtlich keine selektive Permeabilität für verschiedene Molekülgrößen besteht. (Ricketts, 1966) Die Wände der Kapillaren werden für das Albumin (Mw.: 66000) völlig durchlässig. (Cope et al., 1948) Aus dem intravasalen Raum ausgetreten, bewirkt es durch die Erhöhung des kolloid-osmotischen-Drucks einen verstärkten Zufluß von Wasser und Salzen in das Verbrennungsgebiet. (Goodwin et al., 1981)

1.4.6.2. Gamma-Globuline

Die Immunglobulinklassen Ig G, Ig A, Ig M, Ig D und Ig E bilden die Gamma-Globulin-Fraktion des Menschen. Beim Kaninchen fehlt das Ig D.

Die Bildung der Immunglobuline oder Antikörper erfolgt durch B-Lymphozyten nach vorausgegangenem Anstoß durch ein Antigen, eventuell mit Unterstützung von T-Helferzellen, wobei vermutlich von Makrophagen verarbeitetes Antigen T - Zellen zur Freisetzung von Mediatoren veranlaßt, die auf die B-Zellen wirken. (Miller, 1979)

Die Immunglobuline befinden sich hauptsächlich im Blutplasma, aber auch extravasculär in den verschiedenen Körperflüssigkeiten.

Das Ig M kommt im Plasma ringförmig als Pentamer gekoppelt mit einem Molekulargewicht von 950000 vor, während die anderen Immunglobuline ein Molekulargewicht von 200000 nicht überschreiten. Der Wirkungsbereich beschränkt sich deshalb für das Ig M im wesentlichen auf den intravasa-

len Bereich, wo seine Hauptaufgabe im Rahmen der Abwehrfunktion darin besteht, zirkulierende Mikroorganismen zu eliminieren. Bei einem Ig M-Mangel kommt es häufig zu septischen Prozessen mit Gram-negativen-Bakterien. (Ritzmann et al., 1973)

Nach Verbrennungen kommt es zu einer Verminderung der Konzentration aller Immunglobulinklassen, die am 2. - 3. Tag am ausgesprochensten ist. (Arturson et al., 1969; Leguit et al., 1973)

Ursachen für die Senkung der Immunglobulinspiegel sind ein erhöhter Proteinumsatz, Verlust durch Exsudation, Abwanderung ins Interstitium und ein erhöhter Verbrauch. (Arturson et al., 1969)

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten weibliche Chinchilla-Kaninchen (Tierstamm: Chbb: CH/HH) aus der Zuchtanstalt Dr. Karl Thomae GmbH in 7950 Biberach an der Riss. 6 Tiere wurden verbrüht; die Kontrollgruppe bestand aus 3 Tieren. Die Kaninchen waren in Einzelkäfigen bei einer Raumtemperatur von 25 °C untergebracht. Leitungswasser und eine Altromin Standard-Diät konnten sie ad libitum zu sich nehmen. Ihr durchschnittliches Gewicht zu Versuchsbeginn betrug 3,38 $\pm$ 0,39 kg.

Um eine Beeinflussung der Meßergebnisse auf Grund zyklischer Stoffwechselschwankungen möglichst zu vermeiden, wurde mit der Durchführung der Versuche immer zwischen 18 und 19 Uhr begonnen.

2.2. Verbrühung

Das Setzen des thermischen Traumas erfolgte durch halbminütige Verbrühung mit Wasser von 90 °C.

2.2.1. Versuchsdurchführung

Das Versuchstier wurde durch eine Injektion von Pentobarbital-Na. (Nembutal ^{R} ad us. vet.: Abbot, France) in die laterale Ohrvene unter ständiger Kontrolle der Cornealreflexe und der Atmung in eine tiefe Narkose versetzt, gewogen und am Rücken und in der Leistenbeuge rasiert. Die durchschnittliche Menge Pentobarbital, die zum Erreichen der Narkose nötig war, betrug 133 $\pm$ 27 mg, die Konzentration der Lösung 20 mg/ml. Danach folgte das Legen eines zentralen Venenverweilkatheters mit einem Durchmesser von 0,8 x 1,2 mm in die vena femoralis, um sichere und einfache Blutentnahmen während des Versuchs zu gewährleisten. (Stericath 50 cm: Med. chir. Werke, Aachen) Dazu wurde die v. femoralis dextra in Höhe des hiatus saphenus freipräpariert und der Katheter durch eine Öffnung in der Vene bis in den Brustraum vorgeschoben.

Nach der Fixierung des Katheters an der Vene, um ein Hinausgleiten zu verhindern, wurde die Operationswunde geschlossen.

Eine i.m. Injektion von 0,1 mg Atropin (Atropinsulfat: Drobena, Berlin) sorgte für Sekretionshemmung.

Eine halbe Stunde auf die erste Blutentnahme folgte dann die Verbrühung des Versuchstieres, indem die betreffende Rückenfläche 30 Sekunden in ein Wasserbad getaucht wurde, dessen Temperatur thermostatisch auf 90 °C gehalten wurde.

Auch in den weiteren 10 Stunden blieben die Tiere in der Narkose. Die gemittelte Pentobarbitalmenge, die dazu nötig war und durch den Katheter eingespritzt wurde, betrug 39 ± 6 mg pro Stunde.

Die Blutentnahmen erfolgten eine halbe Stunde vor, 0,5, 2,5, 5,0, 7,5 und 10 Stunden nach der Verbrühung.

2.2.2. Bestimmung der verbrühten Körperoberfläche

Die Bestimmung der verbrühten Körperoberfläche wurde nach der modifizierten Methode von Mehrkens vorgenommen. Nach ihr betrug die verbrühte Fläche bei den Versuchstieren 24 %.

1. regio capitis et cervicis	2 x 7,5 %
2. regio interscapularis	2 x 2,0 %
3. regio costalis-subscapularis (mit vorderen Beinen)	2 x 5,0 %
4. regio dorso costalis	2 x 7,0 %
5. regio abdominalis lateralis	2 x 12,0 %
6. regio abdominalis	2 x 9,0 %
7. regio caudalis-inguinalis (mit hinteren Beinen)	2 x 7,5 %

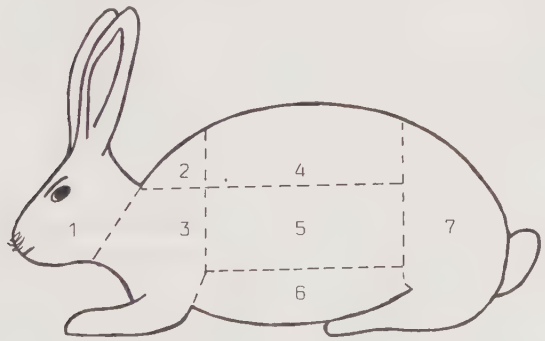


Abb. 5: Unterteilung der Körperoberfläche beim Kaninchen (Mehrkens,1979)

2.3. Aufarbeitung und Lagerung der Blutproben

Die Blutentnahmen erfolgten aus dem Venenverweilkatheter zu den festgesetzten Zeiten. Jeweils 8 ml Blut wurden mit 2 ml Zitrat (Natrium Citrat Lösung 3,31 %; B. Braun, Melsungen) ungerinnbar gemacht. Zur Bestimmung der einzelnen Parameter wurden sie, wie nachfolgend beschrieben, entsprechend vorbehandelt und gelagert:

Adenosin-5'-Phosphate: Enteiweißung; Lagerung im Eisbad;
Bestimmung nach Versuchsende

2,3-Diphosphoglycerat: Enteiweißung; Lagerung bei -27 °C;
Bestimmung nach ca. einer Woche

Bilirubin : Lagerung des Citratplasmas bei 0 °C;
Bestimmung nach Versuchsende

Serotonin, MAO : Lagerung des Citratplasmas bei -27 °C:
Bestimmung innerhalb einer Woche

Elektrolyte, Proteine: Lagerung des Citratplasmas bei -27 °C;
Bestimmung nach Durchführung aller Versuche

2.4. Bestimmungsmethoden

2.4.1. Bestimmung der Plasma-Monoaminooxidase

2.4.1.1. Einleitung

Zum Nachweis der Plasma-Monoaminooxidase (PMAO)-Aktivität ist Benzylamin als Substrat besonders geeignet, da das gebildete Benzaldehyd mit großer Empfindlichkeit spektralphotometrisch nachgewiesen werden kann.

Abb. 6: Reaktionsgleichung der oxidativen Desaminierung

Es steht fest, daß die Oxidation von Benzylamin zum Benzaldehyd enzymatischer Natur ist und keinem anderen Plasmaenzym zugeschrieben werden kann (z.B. Caeruloplasmin).

Die benutzte Bestimmungsmethode garantiert einen mindestens dreistündigen linearen Reaktionsverlauf; außerdem ist die Umsetzung der zugefügten Plasmamenge proportional. (Mc. Ewen und Cohen, 1963)

2.4.1.2. Benutzte Materialien

1. Registrierendes Spektralphotometer DMR 10, Zeiss (Oberkochen)
2. Verschließbare Quarzküvetten, 1 cm Schichtdicke
3. Verschließbare Glaszentrifugenröhrchen
4. Benzylamin Art.: 801812 Merck (Darmstadt)
5. Benzaldehyd Art.: 801756 Merck (Darmstadt)
6. Perchlorsäure 60 % Art.: 518 Merck (Darmstadt)
7. Cyclohexan Art.: 9666 Merck (Darmstadt)
8. Phosphatpuffer:
   $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ Art.: 6580 Merck (Darmstadt)
   KH_2PO_4 Art.: 4873 Merck (Darmstadt)

Zusammensetzung der Pufferlösungen für pH 6 und (pH 8): 8,066 (0,336) g/l KH_2PO_4 und 1,318 (11,431) g/l $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ gelöst in aqua destillata.

2.4.1.3. Bestimmung

In offenen Glaszentrifugenröhrchen wurden die Proben und Proben-Leerwerte 2 Stunden bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die Proben beinhalteten in einem Gesamtvolumen von 1,5 ml:

0,6 ml Plasma; 1:4 verdünnt in physiologischer NaCl-Lösung,

0,75 ml 1/15 M Phosphatpuffer; pH 6 bzw. pH 8,

0,15 ml 0,008 M (1,2 µmol) Benzylamin in 1/15 M Phosphatpuffer.

Der Proben-Leerwert hatte die gleiche Zusammensetzung. Die Benzylaminzugabe erfolgte jedoch erst nach Inkubationsende. Nach Zugabe von 0,15 ml 60 % Perchlorsäure (Beenden der Reaktion) und 3 ml Cyclohexan (Extraktion des Benzaldehyds) wurden die Inhalte durch Schütteln emulgiert und 15 Minuten bei Zimmertemperatur stehengelassen . Einer zweiten Emulgierung folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 4000 UpM.

Die mit einem registrierenden Doppelstrahl-Spektralphotometer aufgezeichneten Differenzspektren der Proben gegen die entsprechenden Leerwerte erstreckten sich über den Wellenlängenbereich von 315-215 nm. Die Extinktion des Cyclohexanextraktes wurde bei 242 nm gemessen, der gerade Kurvenverlauf bei 310 nm diente dabei als Bezugspunkt.

$$E = E_{242nm} - E_{310nm}$$

Hinweis: Zugabe von Cyclohexan und füllen der Küvetten nur mit Glaspipetten!!

2.4.1.4. Eichkurven

Die Erstellung der Eichkurven erfolgte nach der gleichen Methode, wobei statt des Plasmas Benzaldehydlösungen in physiologischer NaCl-Lösung eingesetzt wurden. Die Inkubation im Wasserbad erübrigte sich. Die Benzaldehydmengen [nmol] pro Probenvolumen von 0,15 ml und die gemessenen Extinktionswerte ΔE finden Sie im tabellarischen Anhang. In Abb. 7 sind alle Differenzspektren der Eichlösungen für die beiden pH-Werte aufgezeichnet, neben den Maximalwerten der Extinktionen bei 242 nm sind die dazugehörigen Benzaldehydmengen je Probe von 0,15 ml angegeben. In den Abb. 8 bzw. 9 sind die MAO-Eichkurven für pH 6 und pH 8 dargestellt. Der Korrelationskoeffizient beträgt für beide Geraden $r^2 = 0{,}999$.

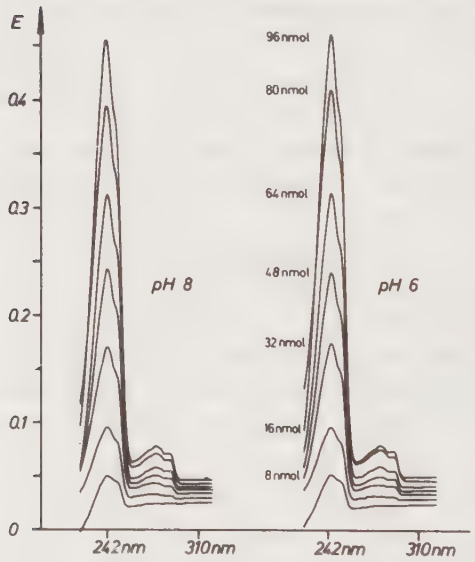


Abb. 7: Differenzspektren der MAO-Eichlösungen

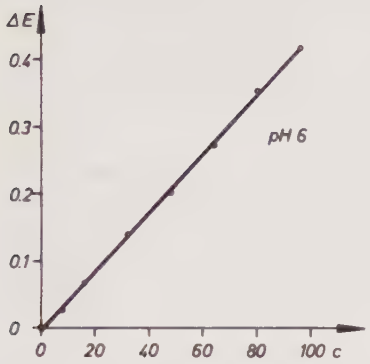
2.4.1.5. Berechnung der Enzymaktivität

Die Berechnung der in 2 Stunden von 0,15 ml Plasma umgesetzten Substratmengen erfolgte mit den Funktionsgleichungen der Eichkurven (Abb. 8 und 9) für die entsprechenden pH-Werte.

$$\text{pH 6: } c = \frac{\Delta E + 0{,}00413}{0{,}00441} \quad ; \quad \text{pH 8: } c = \frac{\Delta E + 0{,}00418}{0{,}00438} \qquad \left[\frac{\text{nmol}}{0{,}15\ \text{ml} \cdot 2\text{h}}\right]$$

Die Enzymaktivitäten wurden in U/l angegeben. (1U = Umsatz von 1 µmol Substrat pro Minute)

$$\text{Enzymaktivität (PMAO)} = c \cdot 55{,}6 \cdot 10^{-3} \quad [\text{U/l}]$$



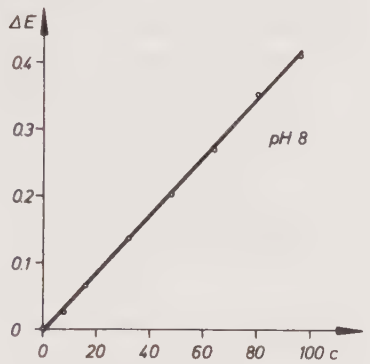


Abb. 8 und 9: MAO-Eichkurven c = Benzaldehydkonzentration $\left[\frac{\text{nmol}}{0{,}15\ \text{ml}}\right]$

2.4.2. Bestimmung des Serotonins

2.4.2.1. Einleitung

Serotonin (5 - Hydroxytryptamin) läßt sich aus boratgepufferten Lösungen (pH 10) mit kochsalzgesättigtem Butanol-(1) extrahieren. Fügt man dem Butanolextrakt n - Heptan und Phosphatpuffer (pH 7) zu, geht das Serotonin in die wäßrige Phase über, die fluorometrisch vermessen wird. (Snyder et al., 1965)

2.4.2.2. Benutzte Materialien

1. Registrierendes Fluoreszenzspektrometer MPF 3 Perkin-Elmer
2. Quarz-Fluoreszenzküvetten, 1 cm Schichtdicke
3. Natriumchlorid Art.: 6404 Merck (Darmstadt)
4. 0,6 N Perchlorsäure Art.:125377 Merck (Darmstadt)
5. Butanol-(1) Art.: 1990 Merck (Darmstadt)
6. n-Heptan Art.: 4379 Merck (Darmstadt)

7. Ninhydrin Art.: 6762 Merck (Darmstadt)
8. Serotonincreatininsulfat Art.: 85030 Fluka (Neu-Ulm)
9. Boratpuffer:
   H_3BO_3 Art.: 165 Merck (Darmstadt)
   1 N NaOH Art.: 9137 Merck (Darmstadt)

- Boratpuffer 0,1 M
  Natriumboratlsg.: 12,37 g Borsäure + 100 ml 1N Natronlauge pro Liter
  Für pH 10: 41,0 ml 0,1 N Natronlauge + 59 ml Natriumboratlösung
- Boratpuffer 0,5 M
  Natriumboratlsg.: 30.93 g Borsäure + 100 ml 1N Natronlauge pro Liter
  Für pH 10: 41,0 ml 0,5 N Natronlauge + 59 ml Natriumboratlösung

10. Phosphatpuffer:
    $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ Art.: 6580 Merck (Darmstadt)
    KH_2PO_4 Art.: 4873 Merck (Darmstadt)

- Phosphatpuffer 0,05 M
  Für pH 7,0: 2,817 g KH_2PO_4 und 5,224 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ pro Liter

2.4.2.3. Bestimmung

Nach Enteiweißung von 1 ml Kaninchenplasma durch 1 ml eiskalte 0,4 N Perchlorsäure und 10-minütiger Zentrifugation bei 3000 UpM wurden 1,5 ml des entstandenen Überstandes mit 2,5 ml 0,4 N Perchlorsäure gemischt und mit 1 N Natronlauge auf pH 10 eingestellt.

Die so vorbehandelte Probe wurde in einem verschließbaren gläsernen Zentrifugengefäß mit 0,5 ml 0,5 M Boratpuffer pH 10, 1,5 g Natriumchlorid und 15 ml Butanol-(1) 10 Minuten geschüttelt und kurz zentrifugiert. 12 ml Butanolextrakt wurden abpipettiert, in einem zweiten Gefäß mit 2 ml 0,1 M Boratpuffer pH 10 und 1,5 g Natriumchlorid 3 Minuten geschüttelt und kurz zentrifugiert, Aus 10 ml entnommenen Butanolextrakt erfolgte in einem dritten Zentrifugengefäß durch Schütteln mit 1,5 ml 0,05 M Phosphatpuffer pH 7 und 15 ml n-Heptan die Überführung des Serotonins in die wäßrige Phase, die nach kurzer Zentrifugation vorsichtig vom Gefäßboden entnommen wurde. Einer halbstündigen Inkubation von 1,2 ml der wäßrigen Phase und 0,1 ml 0,1 M Ninhydrinlösung bei 75 °C folgte nach einer weiteren Stunde die Messung der Fluoreszenzintensität bei 490 nm mit einer Anregungswellenlänge von 385 nm.

Ein Leerwert wurde ebenfalls mit dieser Methode bestimmt, jedoch mit physiologischer Natriumchloridlösung statt Kaninchenplasma.

Aus der Differenz der Fluoreszenzintensitäten zwischen Probe und dem Leerwert ergab sich der Meßwert (ΔF.Int.).

2.4.2.4. Eichkurve

Zur Erstellung der Eichkurve wurden die Fluoreszenzintensitäten von Serotonin in physiologischen NaCl - Lösungen bestimmt, deren Konzentrationen im tabellarischen Anhang aufgelistet sind. In Abb. 10 ist die Eichkurve dargestellt, der Korrelationskoeffizient beträgt $r^2 = 0{,}998$.

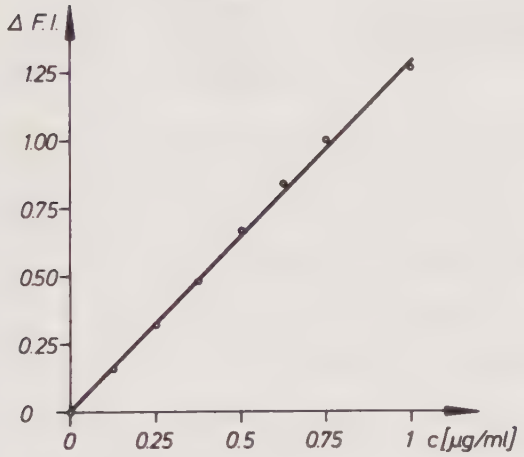


Abb. 10: Serotonin-Eichkurve

2.4.2.5. Berechnung der Serotoninkonzentration

Die Konzentration des Serotonins (c) wurde durch Einsetzen der Fluoreszenzintensität (ΔF.I.) in die Funktionsgleichung der Eichkurve berechnet:

$$c \left[\mu g/ml\right] = \frac{F.I. - 0{,}00276}{1{,}3015}$$

2.4.3. Bestimmung des Gesamt-Bilirubins

2.4.3.1. Einleitung

Das Gesamt - Bilirubin (GB) bildet in Gegenwart von Coffein als Lösungsvermittler für das freie Bilirubin mit diazotierter Sulfanilsäure das entsprechende Azobilirubin, dessen Farbintensität der Bilirubinkonzentration proportional ist und bei 578 nm gemessen wird. (Jendrassik und Gróf, 1938) (siehe Abb. 11)

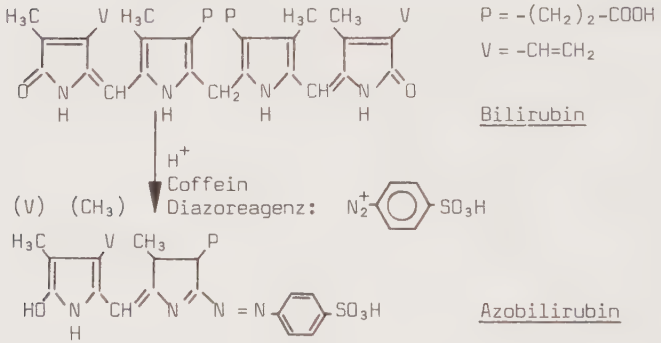


Abb. 11: Reaktionsprinzip der Bilirubinbestimmung

2.4.3.2. Benutzte Materialien

1. Photometer PM 4 Zeiss (Oberkochen)
2. Halbmikroküvetten mit 1 cm Schichtdicke
3. Test-Combination Bilirubin, Best.Nr.:123919 Boehringer (Mannheim)
4. Kontrollserum Monitrol I E Lot-Nr.: 169 AHS (München)

2.4.3.3. Bestimmung

Die im Bestimmungsansatz angegebenen Volumina wurden halbiert. Die Messung der Extinktionen der Probe gegen den Proben-Leerwert bei 578 nm erfolgte deshalb in Halbmikroküvetten: E_{GB}

Berechnung der Gesamtbilirubinkonzentration: $c_{GB}\,[mg/dl] = E_{GB} \cdot 10{,}8$

2.4.3.4. Qualitätskontrolle

Bei jeder Bilirubinbestimmung wurde das Kontrollserum Monitrol I E 1:4 mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnt zur Qualitätskontrolle eingesetzt. Die ermittelten 18 Werte (n=18) lagen immer innerhalb des Vertrauensbereiches.

Monitrol I E : Sollwert 1,40
Vertrauensbereich: 1,22 - 1,58 in mg/dl
erlaubter Bereich: 1,12 - 1,68
Ermittelte Werte: Mittelwert $\pm$ 1 Standardabweichung: 1,31 $\pm$ 0,04

2.4.4. Bestimmung von organischen Phosphaten

2.4.4.1. Bestimmung des Adenosin-5'-triphosphats (ATP)

2.4.4.1.1. Einleitung

Der enzymatische Nachweis von ATP beruht auf dem folgenden Reaktionsprinzip: (Bücher, 1947)

a) Glycerat-3-phosphat + ATP $\xrightarrow{PGK}$ Glycerat-1,3-diphosphat + ADP
PGK: 3-Phosphoglycerat-kinase

b) Glycerat-1,3-diphosphat+NADH $\xrightarrow{GAPDH}$ Glycerinaldehyd-3-phosphat+P_i+NAD^+
GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase

c) Glycerinaldehyd-3-phosphat $\xrightarrow{TIM}$ Dihydroxyacetonphosphat
TIM: Triosephosphat-isomerase

d) NADH + H^+ + Dihydroxyacetonphosphat $\xrightarrow{GDH}$ Glycerin-1-phosphat + NAD^+
GDH: Glycerophosphat-dehydrogenase

NADH ist die Meßgröße. Die ATP-Konzentration ist der Abnahme der NADH-Menge proportional.

2.4.4.1.2. Benutzte Materialien

1. Photometer PMQ 3 mit Küvettenautomatik; Zeiss (Oberkochen)
2. Halbmikroküvetten mit 1 cm Schichtdicke
3. Test-Combination ATP; Best.Nr.: 123897 Boehringer (Mannheim)
4. Perchlorsäure 0,6 N Best.Nr.: 125377 Boehringer (Mannheim)
5. Partigendispenser 5 µl

2.4.4.1.3. Bestimmung

0,5 ml Kaninchenblut wurde mit 2 ml 0,6 N Perchlorsäure enteiweißt, 10 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen und anschließend 10 Minuten bei 3000 UpM zentrifugiert.

Die im Bestimmungsansatz angegebenen Volumina wurden geviertelt und die 0,005 ml Mengen mit einem Partigen-Dispenser 5 µl zugegeben. Die Extinktionsdifferenzen ($E_1 - E_2$) der Proben gegen Luft wurden bei 340 nm gemessen.

$$\text{ATP-Konzentration } c \left[\text{mg/dl}\right] = (E_1 - E_2) \cdot 236$$

2.4.4.2. Bestimmung des Adenosin-5'-di- und -monophosphats (ADP,AMP)

2.4.4.2.1. Einleitung

ADP und AMP werden nach folgendem Prinzip enzymatisch bestimmt (Jaworek et al., 1974)

a) $$\text{AMP} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{MK}} 2\ \text{ADP}$$

MK: Adenylat-kinase

b) $$\text{ADP} + \text{Phosphoenol-pyruvat} \xrightarrow{\text{PK}} \text{ATP} + \text{Pyruvat}$$

PK: Pyruvat-kinase

c) $$\text{Pyruvat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{Lactat} + \text{NAD}^+$$

LDH: Lactat-dehydrogenase

Gemessen wird die Extinktionsabnahme von NADH, die der ADP- bzw. AMP-Konzentration proportional ist.

2.4.4.2.2. Benutzte Materialien

1. Photometer PMQ 3 mit Küvettenautomatik Zeiss (Oberkochen)
2. Halbmikroküvetten mit 1 cm Schichtdicke
3. Test-Combination ADP/AMP: Best.Nr.: 123820 Boehringer (Mannheim)
4. Perchlorsäure 1 N Best.Nr.: 125377 Boehringer (Mannheim)
5. Partigen-Dispenser 5 µl

2.4.4.2.3. Bestimmung

0,75 ml Kaninchenblut wurde mit 0,75 ml eiskalter 1 N Perchlorsäure

enteiweißt und 10 Minuten bei 3000 UpM zentrifugiert. Die im Bestimmungsansatz angegebenen Volumina wurden geviertelt und die 0,005 ml Mengen mit einem Partigen-Dispenser 5 µl zugegeben. Die Extinktionsdifferenzen (E_1-E_2 und E_2-E_3) der Proben gegen Luft wurden bei 340 nm gemessen.

ADP-Konzentration c mg/dl = $(E_1-E_2) \cdot 18{,}3$

AMP-Konzentration c mg/dl = $(E_2-E_3) \cdot 7{,}5$

2.4.4.3. Bestimmung des 2,3-Diphosphoglycerats (2,3-DPG)

2.4.4.3.1. Einleitung

2,3-DPG wird enzymatisch nach dem folgenden Prinzip bestimmt. (Lowry et al., 1964):

a) 2,3-DPG $\xrightarrow[\text{2-Phosphoglycolat}]{\text{2,3-DPG-Phosphatase}}$ 3-Phosphoglycerat + P_i

b) 3-Phosphoglycerat + ATP $\xrightarrow{\text{PGK}}$ 1,3-Diphosphoglycerat + ADP

PGK: 3-Phosphoglycerat-kinase

c) 1,3-Diphosphoglycerat+NADH $\xrightarrow{\text{GAPDH}}$ Glycerinaldehyd-3-phosphat+NAD^+

GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase

Die Abnahme von NADH wird gemessen, sie ist der Konzentration von 2,3-DPG proportional.

2.4.4.3.2. Benutzte Materialien

1. Photometer PM 4 — Zeiss (Oberkochen)
2. Halbmikroküvetten mit 1 cm Schichtdicke
3. Trichloressigsäure 8 %
4. Testpackung 2,3-DPG — Sigma (St. Louis)

2.4.4.3.3. Bestimmung

0,5 ml Kaninchenblut wurde mit 1,5 ml 8 % eiskalter Trichloressigsäure enteiweißt, 5 Minuten in ein Eisbad gestellt und 10 Minuten bei 3000 UpM zentrifugiert. Die Extinktionsdifferenzen der Proben bzw. der Leerwerte wurden bei 340 nm in Halbmikroküvetten gemessen.

Berechnung: $(E_{Probe} - E_{Leerwert}) \cdot 7{,}7 = c_{2,3\text{-DPG}}$ [µmol/ml]

2.4.5. Bestimmung von Magnesium, Zink und Kupfer im Flammenphotometer

2.4.5.1. Einleitung

Bei der Atomabsorptions - Flammenphotometrie nutzt man die Schwächung einer die Flamme durchsetzenden monochromatischen Strahlung aus, die von einer Hohlkathodenlampe (HKL) ausgesandt wird. Hierbei ist in gewissen Grenzen die Extinktion der von der Flamme erzeugten Atome proportional der zugefügten Konzentration in der Probe. Da jedes Atom nur Licht der gleichen Wellenlänge absorbieren kann, die es selbst zu emittieren vermag, (Kirchhoffsches Gesetz der Absorption und Emission) muß durch die HKL eine für dieses Atom charakteristische Emissionslinie erzeugt werden, d.h. für jedes zu bestimmende Element ist das entsprechende Kathodenmaterial erforderlich. (Sitzius, 1977)

2.4.5.2. Benutzte Materialien

1. Atom - Absorptions / Emissions - Spektrometer 4000, Perkin Elmer
2. Hohlkathodenlampen, Einzelelement, Perkin Elmer (Überlingen)
3. Standardlösungen:

Mg-Späne	Art.: 805817	Merck	(Darmstadt)
Zn-Pulver	Art.: 8789	Merck	(Darmstadt)
Titrisol (Cu)	Art.: 9987	Merck	(Darmstadt)

2.4.5.3. Bestimmung

Die Bestimmung von Magnesium, Zink und Kupfer erfolgte mit dem Atomabsorptions / Emissions - Spektrometer in der Betriebsart Atom-Absorption (AA), wobei der Lampenstrahl alternierend durch den Probenraum und an diesem vorbei geleitet wurde (mechanisch gechoppt). Justierung, Brenngaseinstellung, Empfindlichkeitsprüfung usw. erfolgte nach den Vorschriften in der Betriebsanleitung.

Die zu untersuchenden Lösungen wurden in einer Vorkammer an einem Mischflügel aus Kunststoff zerstäubt und in einem Titan-Einschlitz-Brenner (l = 10 cm) in einer laminaren Luft/Acetylen-Flamme verbrannt.

Die Meßwertausgabe erfolgte direkt in Konzentrationseinheiten durch den Mikroprozessor des Gerätes, der auch die dafür nötigen Eichkurven aus Eichlösungen, deren eingegebene Konzentrationswerte und Nullösungen erstellte.

Zur Bestimmung der einzelnen Elemente wurden die unten aufgeführten Einstellungen, Eichlösungskonzentrationen und Probenverdünnungen benutzt:

Tab. 1: Einstellungen, Eichlösungskonzentrationen und Probenverdünnungen

	Magnesium	Zink	Kupfer
Emissionslinie [nm]	285,2	213,9	324,8
Eichlösung [mg/l]	0,5	0,5	4,0
Probenverdünnung	1:100	1:10	1:3
Integrationszeit [s]	0,3	0,3	0,3
Anzahl der Messungen	30	25	10

2.4.5.4. Qualitätskontrolle

Zur Kontrolle der Meßwerte wurden bei der Bestimmung der Proben eines jeden Kaninchens die Konzentrationen der drei Elemente in einem Kontrollserum (Seronorm ^{R}) ermittelt. Die gemessenen Konzentrationen lagen für alle drei Elemente innerhalb des angegebenen Sollbereichs .(Tab. 2)

Tab. 2: Meßwerte und Sollwerte für das Kontrollserum
Anzahl der Proben für jedes Element : n = 18

	Magnesium [mmol/l]	Zink [µg/dl]	Kupfer [µg/dl]
ermittelte Konz. ± 1 SD	0,905 ± 0,008	91,8 ± 1,5	104,7 ± 1,2
Sollbereich	0,88 - 0,98	83 - 96	93 - 105

2.4.6. Quantitative Immunologische Proteinbestimmung

Bestimmung von Albumin , Gammaglobulin und Ig M im Lasernephelometer

2.4.5.1. Grundlagen der Lasernephelometrie (LN)

Proteine können mit Hilfe von Laser-Streulichtmessung (Nephelometrie) an Antigen - Antikörper - Komplexen quantitativ bestimmt werden. (Sieber, 1976, 1979) Die Anwendung des hochenergetischen , monochromatischen Laserlichts definierter Wellenlänge erlaubt die Messung des intensiveren Vorwärtsstreulichts der Immunkomplexe, da der direkte Lichtstrahl wegen seiner Parallelität vollständig ausgeblendet werden kann.

Nach Mie ergibt sich ein unsymmetrisches Strahlungsdiagramm bezogen auf die Fortpflanzungsrichtung und zwar überwiegt die Vorwärtsstreuung je größer der Streuparameter $k = 2\pi d/\lambda$ wird, d.h. wenn die Immunkomplexe einen größeren Durchmesser als die Wellenlänge haben (Mie - Streuung). (Dettmar, 1963)

Abb. 12: Mie - Streuung
(Partikelgröße > Wellenlänge) Intensitätsverteilung des Streulichts

Die gerade in Vorwärtsrichtung besonders große Intensität des Streulichts bewirkt eine hohe Empfindlichkeit dieser Meßanordnung, weshalb auf einen Photomultiplier verzichtet werden kann. Da das Anregungslicht in einer Lichtfalle eliminiert wird, wird das Vorwärtsstreulicht in einem Raumwinkelbereich von 5° bis 12° gemessen. Durch den konstanten Strahlungsfluß des Lasers ist eine gute Reproduzierbarkeit der Messungen gegeben.

Die Lasernephelometrie erlaubt eine schnelle, einfache und zuverlässige quantitative Proteinbestimmung, die hinsichtlich Exaktheit der radialen Immundiffusion durchaus ebenbürtig ist(Conrad et al.,1978).

2.4.6.2. Benutzte Materialien

1. Laser-Nephelometer (Behringwerke, Marburg) mit einem Helium - Neon Laser (Wellenlänge: 632,8 nm; 5 mW Leistung; Meßbereich: 0-19,99 V)
2. Rechner: Hewlett Packard HP 85 mit einem BCD - Interface 82941 A
3. Sarstedt LN-Küvetten OVEI 04/05
4. Minisart-Einwegfilter SM 16529 (0,2 µm Porengröße) Sartorius,(GÖ)
5. Antiseren:
   - Goat Anti Rabbit Albumin Lot Nr.: 1913 (Atlanta, Heidelberg)
   - Goat Anti Rabbit γ-Globulin Lot Nr.: 118907 B (Behringwerke)
   - Goat Anti Rabbit Ig M Lot Nr.: 1094 (Atlanta, Heidelberg)
6. Proteine:
   - Rabbit Albumin Lot Nr.: 1581 (Atlanta, Heidelberg)
   - Rabbit γ-Globulin Lot Nr.: 3493 (Atlanta, Heidelberg)
   - Rabbit Ig M Lot Nr.: 1534 (Atlanta, Heidelberg)
7. Polyethylenglycol - Puffer Konzentrat 50 %; Lot Nr.: 0716/012 (Im-
8. Staubfreie physiol. NaCl-Lösung muno Diagnostika, Wien)

2.4.6.3. Allgemeine Durchführung der Bestimmungen

Zur Erstellung der Eichkurven wurden die drei Proteine in geeigneten Konzentrationen in physiologischer Natriumchlorid-Lösung eingewogen und dienten so als Standardsera. Die drei lyophilisierten Antisera wurden vorschriftsmäßig gelöst und alle mit 2 % Polyethylenglycol-Puffer verdünnt. Die Verdünnung des Kaninchenplasmas erfolgte mit physiologischer Natriumchloridlösung. Alle Lösungen und das unverdünnte Kaninchenplasma wurden vor der Verwendung filtriert.

In die Küvetten wurden immer zuerst je 100 µl der Standard- oder Kaninchenplasmaverdünnung, dann je 200 µl Antiserumverdünnung einpipettiert. Mischung erfolgte durch leichtes Schwenken unter Vermeidung von Blasenbildung. Die Reaktionszeit betrug für alle Proteine 90 Minuten. Nach der Aufstellung von geeigneten Eichkurven; d.h. möglichst linear und nicht in der Nähe des Maximums der Heidelberger-Kurve, folgte die Abspeicherung im Rechner. Aus den Meßwerten der Kaninchenproben konnten dann die Proteinkonzentrationen errechnet und ausgedruckt werden.

2.4.6.4. Eichkurven: Albumin, Gamma-Globulin, Ig M

Die Eichkurven wurden mit einem Programm der Behringwerke (Marburg) aus den Mittelwerten von drei Bestimmungen berechnet. Die Küvettenfüllung bestand aus 100 µl Standardlösung und 200 µl Antiserum 1:5 verdünnt mit 2 % Polyethylenglycolpuffer. In den Abb. 13 - 15 ist die Abhängigkeit der Nephelometerspannung U [Volt] von der Konzentration der Standardlösung c [mg/dl] doppel-logarithmisch (ln) für die drei Proteine dargestellt:

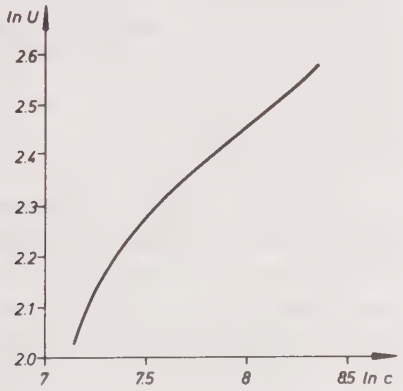


Abb. 13: Eichkurve: Albumin

U: Spannung [V]
c: Konz.[mg/dl]
ln: log nat

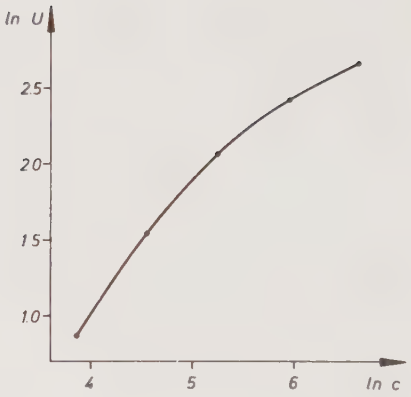


Abb. 14: Eichkurve: Gamma-Globulin

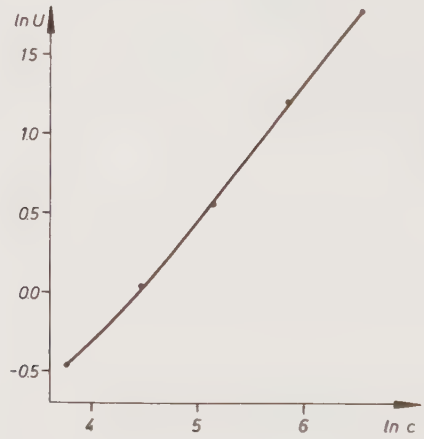


Abb. 15: Eichkurve: Ig M

Im tabellarischen Anhang sind die Konzentrationen der Standardlösungen, die Spannungsmeßwerte des Nephelometers und die prozentualen Abweichungen der Eichkurven aufgelistet.

2.4.6.5. Bestimmung

Bei den einzelnen Bestimmungen wurden die Kaninchenplasmaproben verdünnt eingesetzt; Albumin: 1 in 520, Gamma-Globulin: 1 in 52 und Ig M: 1 in 11. Die Durchführung der Bestimmungen erfolgte wie unter 2.4.6.3. beschrieben. Durch Eingabe der Verdünnungsfaktoren in den Rechner konnten die Konzentrationen der Proben mit den gespeicherten Eichkurven berechnet werden.

3. Ergebnisse

Die Meßergebnisse der einzelnen Parameter werden in prozentualen Anteilen von den Anfangswerten vor Versuchsbeginn (t = -0,5 h) ausgedrückt. Die Verbrühung erfolgte zum Zeitpunkt t = 0 h.

Zur einfacheren Orientierung ist das Verhalten der Parameter in Kurvenverläufen der gemittelten Prozentsätze mit den dazugehörigen Standardabweichungen ($\pm$ 1 s) graphisch dargestellt.

Wenn sich die Standardabweichungen der verbrühten Tiere und der Kontrolltiere überschneiden, werden diese im Überschneidungsgebiet weggelassen.

Abkürzungen: $\bar{x}$: Mittelwert der Prozentsätze
s: Standardabweichung
t: Zeit
h: Stunde

Die Verdünnung der Proben durch die bei der Entnahme zugefügte Zitratlösung wurde bei der Berechnung der Konzentrationen rechnerisch berücksichtigt.

3.1. Bilirubin

Die Anfangskonzentration (= 100 %) des Gesamtbilirubins im Plasma aller Versuchstiere beträgt 0,195 ± 0,025 mg/dl. Nach der Verbrühung steigt der Gesamtbilirubingehalt gleichmäßig an und liegt mit einer Zunahme von ca. 70 % nach zehn Stunden deutlich über der während des ganzen Versuchs kaum veränderten Konzentration der Kontrolltiere.

t [h]	Verbrühung	Kontrolle
-0,5	100 %	100 %
0,5	111 ± 14 %	97 ± 2 %
2,5	135 ± 30 %	94 ± 6 %
5,0	151 ± 36 %	97 ± 4 %
7,5	161 ± 27 %	98 ± 11 %
10,0	170 ± 15 %	100 ± 13 %

Tab. 3: Gesamtbilirubin ($\bar{x} \pm s$) in Prozenten vom Anfangswert

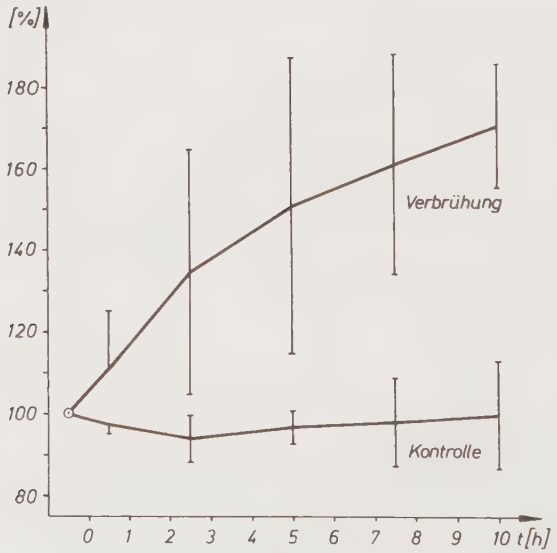


Abb. 16: Gesamtbilirubin ($\bar{x} \pm s$) in Prozenten vom Anfangswert

3.2. Serotonin

Die Anfangskonzentration (= 100 %) des Serotonins im Plasma aller Tiere beträgt 208 ± 46 ng/ml.

Die Serotoninkonzentration zeigt nach der Verbrühung einen steilen Anstieg, erreicht nach 5 Stunden mit über 500 % des Anfangswertes das Maximum und fällt dann langsam ab. Im Gegensatz zu dieser großen Serotoninfreisetzung sind die Werte der Kontrolltiere nur kurzzeitig erhöht und liegen von der 5. Stunde an wieder nahe des Anfangswertes.

t [h]	Verbrühung	Kontrolle
-0,5	100 %	100 %
0,5	299 ± 96 %	139 ± 40 %
2,5	408 ± 104 %	213 ± 129 %
5,0	512 ± 183 %	131 ± 15 %
7,5	464 ± 134 %	123 ± 10 %
10,0	395 ± 131 %	112 ± 18 %

Tab. 4: Serotonin ($\bar{x} \pm s$) in Prozenten vom Anfangswert

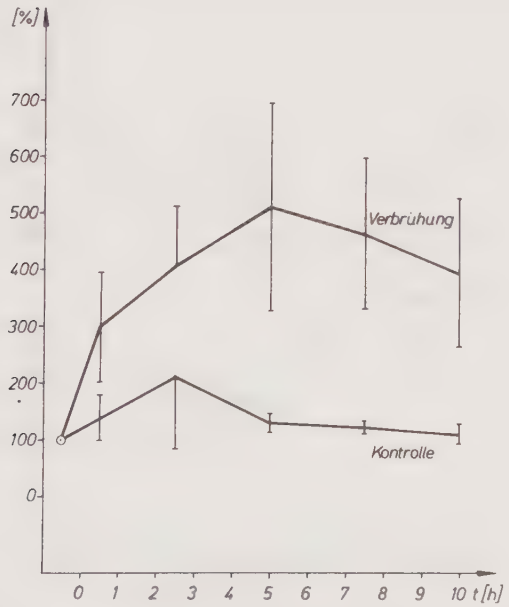


Abb. 17: Serotonin ($\bar{x} \pm s$) in Prozenten vom Anfangswert

3.3. Monoaminooxidase

3.3.1. Bestimmung bei pH 6

Die bei pH 6 bestimmte Monoaminooxidase hat eine Anfangsenzymaktivität (= 100 %) von 2,82 ± 0,68 U/l für alle Kaninchen. Bei den verbrühten Tieren fällt die Enzymaktivität langsam ab und beträgt nach zehn Stunden 75 % vom Anfangswert. Bei den Kontrolltieren ist keine nennenswerte Änderung festzustellen.

t [h]	Verbrühung	Kontrolle
-0,5	100 %	100 %
0,5	105 ± 13 %	112 ± 22 %
2,5	94 ± 6 %	105 ± 17 %
5,0	92 ± 17 %	106 ± 11 %
7,5	82 ± 12 %	103 ± 10 %
10,0	75 ± 9 %	111 ± 15 %

Tab. 5: Monoaminooxidase pH 6 ($\bar{x} \pm s$) in Prozenten vom Anfangswert

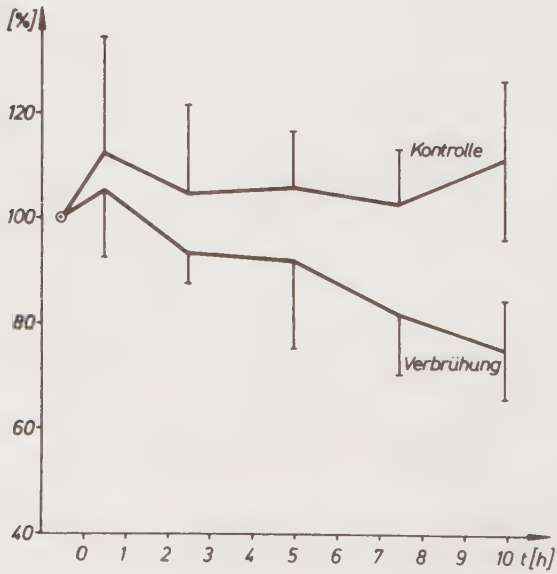


Abb. 18: Monoaminooxidase pH 6 ($\bar{x} \pm s$) in Prozenten vom Anfangswert

3.3.2. Bestimmung bei pH 8

Die bei pH 8 bestimmte Monoaminooxidase hat eine Anfangsenzymaktivität (= 100 %) von 2,33 ± 0,77 U/l für alle Kaninchen. Nach Verbrühung nimmt die Enzymaktivität fast gleichmäßig ab und beträgt nach 10 Stunden ca. 50 % vom Anfangswert. Die Werte für die Kontrolltiere ändern sich kaum.

t [h]	Verbrühung	Kontrolle
-0,5	100 %	100 %
0,5	96 ± 7 %	91 ± 11 %
2,5	78 ± 19 %	94 ± 11 %
5,0	75 ± 18 %	92 ± 6 %
7,5	61 ± 5 %	89 ± 19 %
10,0	51 ± 7 %	98 ± 9 %

Tab. 6: Monoaminooxidase pH 8 ($\bar{x} \pm s$) in Prozenten vom Anfangswert

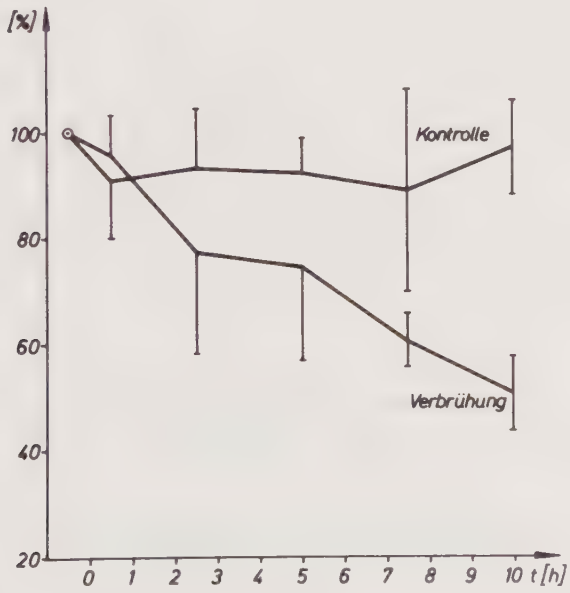


Abb. 19: Monoaminooxidase pH 8 ($\bar{x} \pm s$) in Prozenten vom Anfangswert

3.4. Organische Phosphate

3.4.1. Adenosin-5'-phosphate

Die Anfangskonzentrationen im enteiweißten Blut aller Versuchstiere betragen für die drei Adenosin-5'-phosphate; ATP: 35,4 ± 3,2 mg/dl, ADP: 3,32 ± 0,34 mg/dl und AMP: 0,307 ± 0,040 mg/dl.

In der ersten halben Stunde nach Verbrühung nimmt die ATP-Konzentration um ca. 25 % zu und steigt dann langsam weiter auf ca. 145 % des Anfangswertes nach 10 Stunden an.

Die ADP bzw. AMP-Konzentrationen erreichen nach 2,5 Stunden 140 % bzw. 130 % vom Anfangswert und fallen danach wieder ab.

Bei den Kontrolltieren ist beim ATP und ADP keine deutliche Veränderung, beim AMP eine leichte Zunahme um ca. 10 % festzustellen.

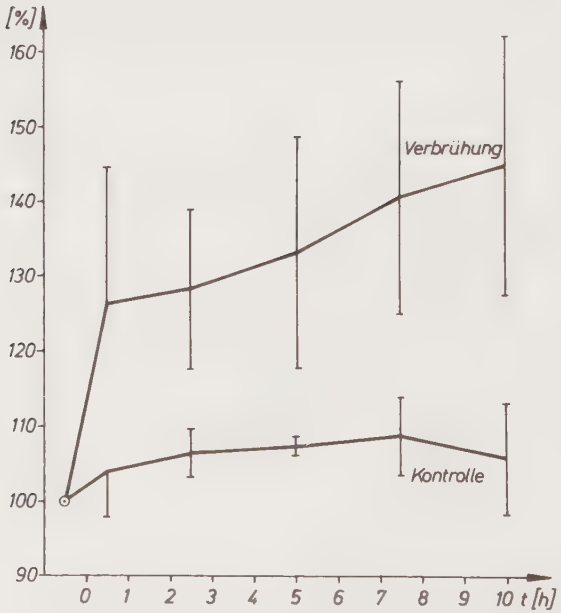


Abb. 20: ATP ($\bar{x} \pm s$) in Prozenten vom Anfangswert

t [h]	Verbrühung	Kontrolle
-0,5	100 %	100 %
0,5	126 ± 19 %	104 ± 6 %
2,5	128 ± 11 %	106 ± 3 %
5,0	133 ± 15 %	107 ± 1 %
7,5	141 ± 16 %	109 ± 5 %
10,0	145 ± 17 %	106 ± 8 %

Tab. 7: ATP ($\bar{x} \pm s$) in Prozenten vom Anfangswert

t [h]	Verbrühung	Kontrolle
-0,5	100 %	100 %
0,5	126 ± 44 %	97 ± 9 %
2,5	141 ± 29 %	95 ± 13 %
5,0	133 ± 26 %	93 ± 7 %
7,5	122 ± 30 %	88 ± 17 %
10,0	120 ± 35 %	97 ± 6 %

Tab. 8: ADP ($\bar{x} \pm s$) in Prozenten vom Anfangswert

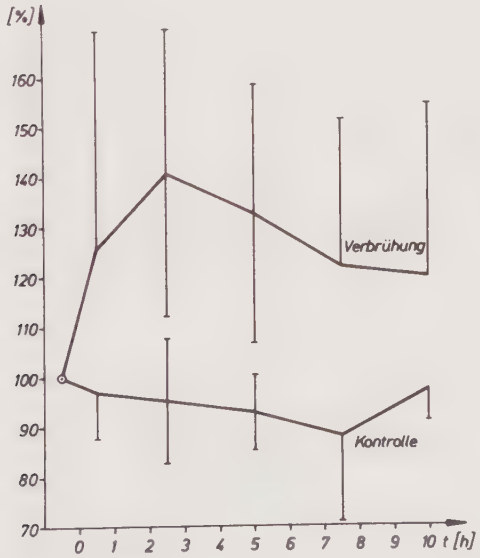


Abb. 21: ADP ($\bar{x} \pm s$) in Prozenten vom Anfangswert

t [h]	Verbrühung	Kontrolle
-0,5	100 %	100 %
0,5	110 ± 32 %	92 ± 9 %
2,5	129 ± 25 %	93 ± 1 %
5,0	115 ± 22 %	89 ± 4 %
7,5	111 ± 27 %	82 ± 8 %
10,0	106 ± 38 %	87 ± 12 %

Tab. 9: AMP ($\bar{x} \pm s$) in Prozenten vom Anfangswert

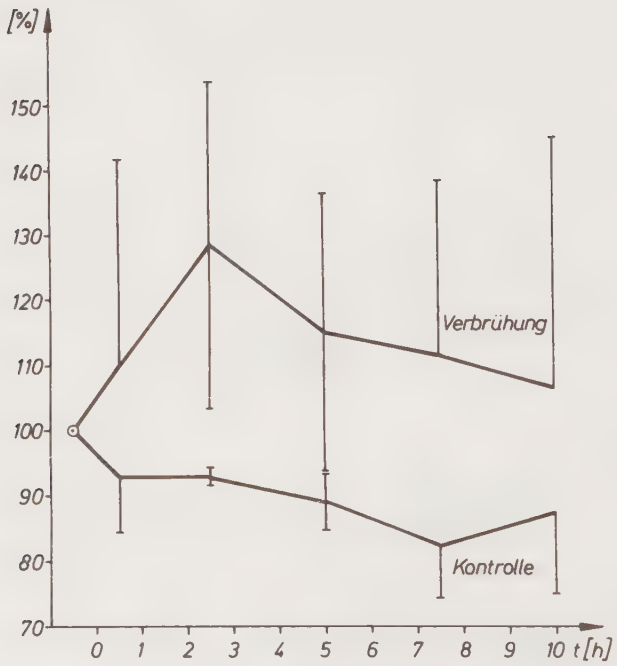


Abb. 22: AMP ($\bar{x} \pm s$) in Prozenten vom Anfangswert

3.4.2. Energy Charge

Nach einem anfänglichen Abfallen des Energy Charge der verbrühten Tiere, steigt dieser im Verlauf des Beobachtungszeitraums in etwa demselben Maße an, wie der Energy Charge der Kontrolltiere. Die Energiesättigung der Adenosin-5'-phosphate nimmt also bei beiden Gruppen zu.

t [h]	Verbrühung	Kontrolle
-0,5	0,9488	0,9511
0,5	0,9503	0,9542
2,5	0,9455	0,9561
5,0	0,9506	0,9575
7,5	0,9561	0,9601
10,0	0,9575	0,9554

Tab. 10: Energy Charge

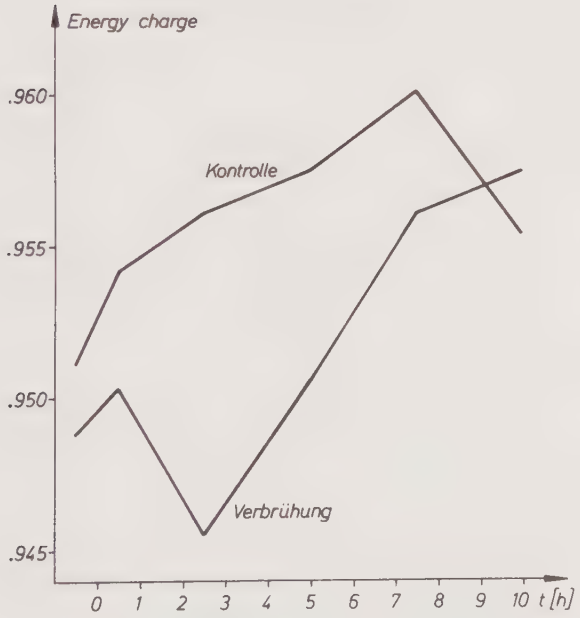


Abb. 23: Energy Charge

3.4.3. 2,3-Diphosphoglycerat (2,3-DPG)

Die Anfangskonzentration (= 100 %) des 2,3-Diphosphoglycerats im enteiweißten Blut aller Kaninchen beträgt 3,80 ± 0,39 µmol/ml.

Die Verbrühung führt initial zu einer deutlich erhöhten Konzentration des 2,3-DPG um ca. 25 %, die während des Beobachtungszeitraumes auf den Anfangswert zurückfällt. Die 2,3-DPG-Konzentration der Kontrolltiere nimmt leicht ab.

t [h]	Verbrühung	Kontrolle
-0,5	100 %	100 %
0,5	125 ± 2 %	96 ± 4 %
2,5	118 ± 7 %	99 ± 8 %
5,0	114 ± 12 %	92 ± 4 %
7,5	106 ± 8 %	92 ± 3 %
10,0	102 ± 6 %	92 ± 9 %

Tab. 11: 2,3-DPG ($\bar{x}$ ± s) in Prozenten vom Anfangswert

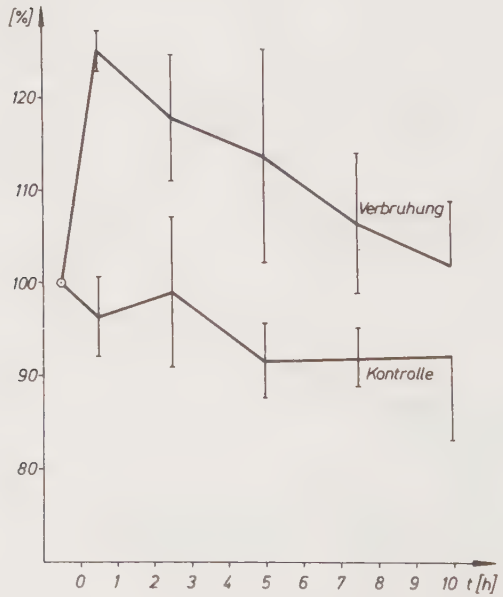


Abb. 24: 2,3-DPG ($\bar{x}$ ± s) in Prozenten vom Anfangswert

3.5. Elektrolyte: Zink, Magnesium und Kupfer

3.5.1. Zink (Zn)

Das Zink liegt in einer Anfangskonzentration (= 100 %) von 147 ± 41 µg/dl im Plasma aller Kaninchen vor.

Nach der Verbrühung steigt die Zn-Konzentration initial um ca. 10 % an, fällt dann aber ab und beträgt nach 10 Stunden ca. 65 % des Anfangswertes. Der Zinkspiegel der Kontrolltiere zeigt ein analoges Verhalten, sodaß, wenn beide Gruppen miteinander verglichen werden, kein deutlicher Unterschied besteht.

t h	Verbrühung	Kontrolle
-0,5	100 %	100 %
0,5	101 ± 8 %	100 ± 4 %
2,5	113 ± 16 %	103 ± 15 %
5,0	102 ± 14 %	91 ± 14 %
7,5	78 ± 11 %	83 ± 24 %
10,0	67 ± 17 %	76 ± 30 %

Tab. 12: Zink ($\bar{x}$ ± s) in Prozenten vom Anfangswert

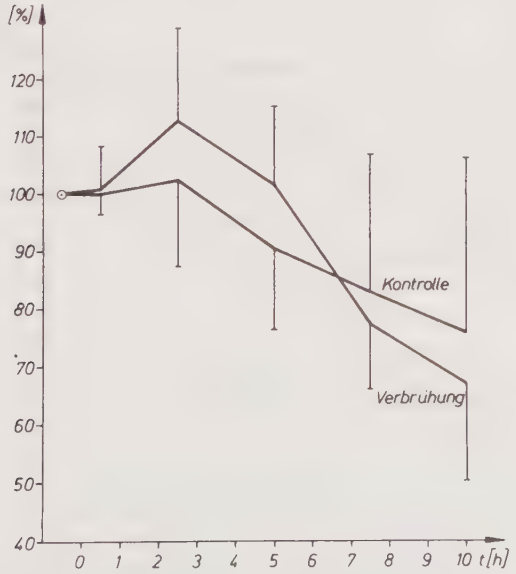


Abb. 25: Zink ($\bar{x}$ ± s) in Prozenten vom Anfangswert

3.5.2. Magnesium (Mg)

Die Anfangskonzentration (=100%) des Magnesiums im Plasma aller Versuchstiere beträgt 0,916 ± 0,157 mmol/l.

Im Gegensatz zur Kontrollgruppe, bei der nur eine geringe Zunahme festzustellen ist, steigt der Magnesiumspiegel bei den verbrühten Tieren während des Beobachtungszeitraums gleichmäßig auf das Doppelte.

t h	Verbrühung	Kontrolle
-0,5	100 %	100 %
0,5	121 ± 7 %	95 ± 12 %
2,5	149 ± 25 %	100 ± 12 %
5,0	162 ± 19 %	106 ± 12 %
7,5	186 ± 14 %	112 ± 16 %
10,0	204 ± 36 %	110 ± 7 %

Tab. 13: Magnesium ($\bar{x}$ ± s) in Prozenten vom Anfangswert

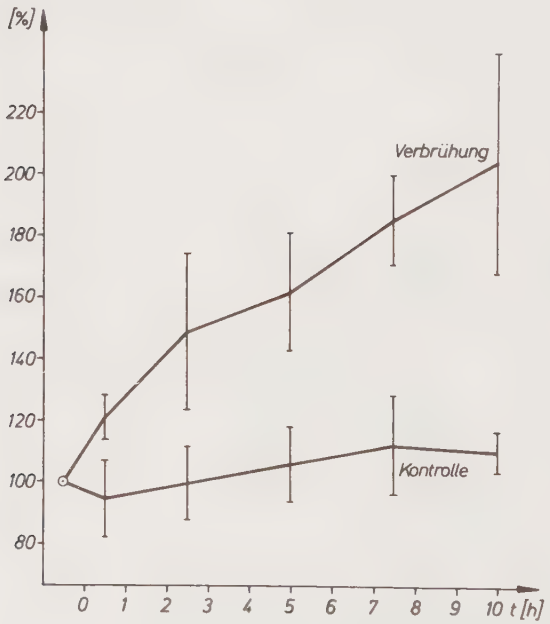


Abb. 26: Magnesium ($\bar{x}$ ± s) in Prozenten vom Anfangswert

3.5.3. Kupfer (Cu)

Die Anfangskonzentration (= 100 %) des Kupfers im Plasma aller Versuchstiere beträgt 68,8 ± 22,0 µg/dl.

Nach Verbrühung fällt die Cu-Konzentration deutlich um 35 % im Versuchszeitraum, während bei den Kontrolltieren nur eine leichte Verminderung um 9 % festzustellen ist.

t [h]	Verbrühung	Kontrolle
-0,5	100 %	100 %
0,5	88 ± 7 %	98 ± 7 %
2,5	81 ± 6 %	93 ± 8 %
5,0	75 ± 8 %	91 ± 7 %
7,5	67 ± 6 %	91 ± 9 %
10,0	65 ± 7 %	91 ± 9 %

Tab. 14: Kupfer ($\bar{x} \pm s$) in Prozenten vom Anfangswert

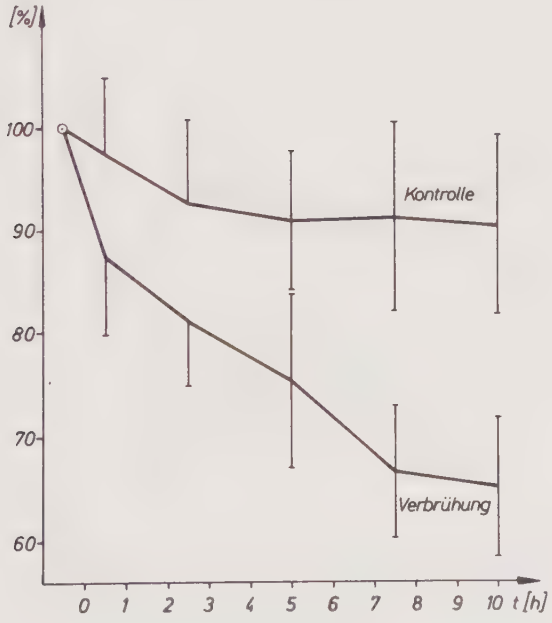


Abb. 27: Kupfer ($\bar{x} \pm s$) in Prozenten vom Anfangswert

3.6. Proteine

3.6.1. Albumin

Die Anfangskonzentration (= 100 %) des Albumins im Plasma aller Versuchstiere beträgt 2,80 ± 0,13 g/dl.

Die Verbrühung führt zu einer deutlichen Verminderung des Albumingehaltes und zwar um 25 % innerhalb des Beobachtungszeitraumes. Die Konzentration der Versuchstiere änderte sich kaum.

t [h]	Verbrühung	Kontrolle
-0,5	100 %	100 %
0,5	93 ± 4 %	99 ± 3 %
2,5	84 ± 6 %	96 ± 5 %
5,0	82 ± 7 %	94 ± 5 %
7,5	79 ± 6 %	95 ± 4 %
10,0	75 ± 7 %	95 ± 2 %

Tab. 15: Albumin ($\bar{x}$ ± s) in Prozenten vom Anfangswert

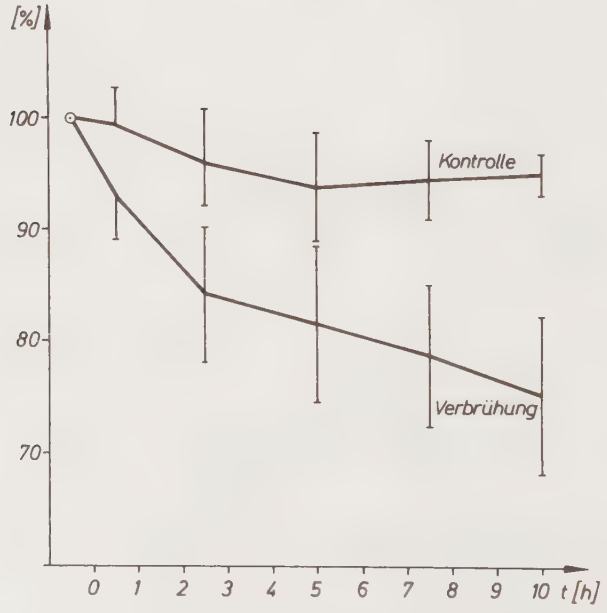


Abb. 28: Albumin ($\bar{x}$ ± s) in Prozenten vom Anfangswert

3.6.2. Gamma-Globuline

Der Anfangswert (= 100 %) der Gamma-Globuline im Plasma aller Versuchstiere beträgt 489,6 ± 57,6 mg/dl.

Im Gegensatz zu den Kontrolltieren, bei denen keine nennenswerte Veränderung festzustellen ist, erfolgt nach Verbrühung eine bedeutende Verminderung der Gamma-Globulin-Fraktion um ca. 30 % in zehn Stunden.

t [h]	Verbrühung	Kontrolle
-0,5	100 %	100 %
0,5	97 ± 10 %	96 ± 4 %
2,5	88 ± 6 %	101 ± 3 %
5,0	82 ± 7 %	93 ± 6 %
7,5	75 ± 5 %	93 ± 6 %
10,0	73 ± 7 %	96 ± 7 %

Tab. 16: Gamma-Globulin ($\bar{x} \pm s$) in Prozenten vom Anfangswert

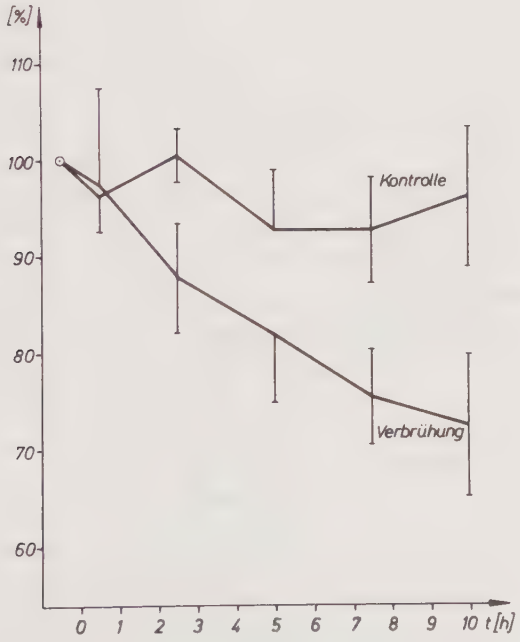


Abb. 29: Gamma-Globulin ($\bar{x} \pm s$) in Prozenten vom Anfangswert

3.6.3. Immunglobulin-M

Der Ig M - Anfangsgehalt (= 100 %) im Plasma aller Versuchstiere beträgt 44,4 ± 5,9 mg/dl.

Nach einem initialen Anstieg um ca. 10 %, folgt eine Abnahme des Ig M auf 80 % des Anfangswertes zum Ende des Versuchs. Die Ig M-Konzentration der Kontrolltiere nimmt in wesentlich geringerem Maße ab.

t [h]	Verbrühung	Kontrolle
-0,5	100 %	100 %
0,5	113 ± 9 %	98 ± 3 %
2,5	110 ± 9 %	98 ± 3 %
5,0	99 ± 9 %	95 ± 3 %
7,5	87 ± 8 %	92 ± 2 %
10,0	80 ± 10 %	93 ± 1 %

Tab. 17: Ig M ($\bar{x} \pm s$) in Prozenten vom Anfangswert

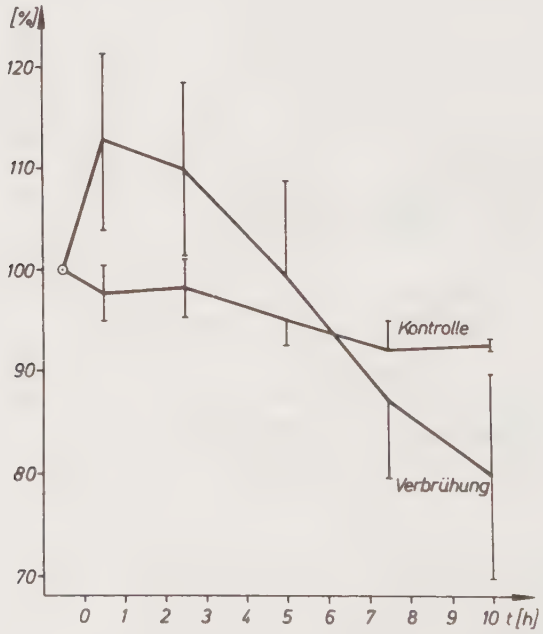


Abb. 30: Ig M ($\bar{x} \pm s$) in Prozenten vom Anfangswert

4. Diskussion der Ergebnisse

Den Kaninchen wurde mit 48 ml Blut ein relativ großer Teil ihres Blutvolumens entnommen und der Verlust nur zu einem Teil, d.h. 26 ml durch physiologische NaCl-Lösung mit dem darin gelösten Pentobarbital ersetzt. Dennoch änderten sich die Werte bei den Kontrolltieren nicht nennenswert. Bei größeren Verbrühungen wird die primäre Letalität so hoch, daß eine unvertretbar hohe Zahl von Versuchstieren geopfert werden muß; demgegenüber kann durch zusätzliche Entnahme von Volumen die Schocksituation soweit verstärkt werden, daß diese hämodynamisch einer stärkeren Verbrühung oder einer, in der Praxis häufigen Kombinations-Verletzung, z.B. mit Frakturen entspricht. Die Auswirkungen einer Infusionstherapie, wie sie in späteren Untersuchungen vorgesehen ist, kann unter diesen Voraussetzungen weit realistischer beurteilt werden, als nach einer Verbrühung von 24 %, wie sie hier durchgeführt wurde. Darüberhinaus wird die verbrennungsspezifische Hämokonzentration durch diesen Vollblutverlust nicht beeinflußt.

4.1. Gesamtbilirubin

Der Gesamtbilirubingehalt im Plasma der verbrühten Tiere scheint anzusteigen. In 10 Stunden nimmt die Konzentration von 0,2 mg / dl auf 0,3 mg / dl zu. Dieses Phänomen könnte durch die Zerstörung der Erythrozyten erklärt werden. (Sevitt, 1979) Es würde sich dann um indirektes Bilirubin handeln. Die Methode erfaßt jedoch Veränderungen in diesem niederen Bereich nur sehr ungenau, sodaß eine isolierte Bestimmung von direktem und indirektem Bilirubin nicht sinnvoll erscheint. Es muß nicht damit gerechnet werden, daß eine Hämokonzentration hier zu einem relativen Anstieg dieser Werte führte. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen ist beim Kaninchen ein derartiger Effekt nicht in signifikanter Form nachweisbar. (Bucher, 1986)

4.2. Serotonin

Die verbrühten Tiere haben nach wenigen Stunden einen auf das fünffache angestiegenen Plasma - Serotoninspiegel, was auf einen erheblichen Zerfall von Thrombozyten schließen läßt.

Die vergleichsweise geringe und kurzfristige Serotonin - Freisetzung bei den Kontrolltieren ist wahrscheinlich auf das Legen des zentralen

Venenverweilkatheters zurückzuführen.

Die hier gemessenen Schwankungsbreiten sind mit Sicherheit nicht der alleinige Ausdruck einer Hämokonzentration.

Serotonin verstärkt die Kreislaufzentralisation (Saxena et al., 1978) und ist mitverantwortlich für die Oligurie nach Verbrennungen. (Geißler und Mutschler, 1977)

4.3. Monoaminooxidase

Nach der Verbrühung zeigt die bei pH 6 bestimmte Plasma-Monoaminooxidase einen Aktivitätsverlust von 25 %, die bei pH 8 bestimmte einen Aktivitätsverlust von 50 % nach 10 Stunden. Es wird also ein unterschiedliches Verhalten der beiden "Isoenzyme" deutlich.

Auch Lewinsohn (1977) beobachtet bei Verbrennungspatienten eine Verminderung, wobei sehr niedrige Werte, bis zu einem völligen Aktivitätsverlust erreicht werden, und der Verlust an Aktivität mehrere Monate bestehen bleibt.

4.4. Organische Phosphate

4.4.1. Adenosin-5'-Phosphate

Der erwartete Adenosin-5'-triphosphat-Verlust tritt nach der Verbrühung nicht auf, vielmehr steigt die ATP-Konzentration im Blut steil an und liegt nach 10 Stunden um 40 % deutlich über den Kontrolltieren. Die Adenosin-5'-diphosphat-Konzentration ist ebenfalls erhöht. Der Energy-Charge zeigt eine geringe Zunahme.

Bei Versuchen mit Ratten wird ein mit der Zeit und Schwere des Verbrennungstraumas immer stärkerer Abfall des ATP festgestellt; erhöhte Werte liegen jedoch innerhalb der ersten 12 Stunden vor. (Domres, 1977)

Einen möglichen Beitrag zur gleichzeitigen Erhöhung aller Adenosin-5'-Phosphate könnte der nach Verbrennungen steigende Hämatokrit-Wert liefern. (Sevitt, 1979; Domres, 1977) Da die Adenosin-5'-Phosphate nicht im Plasma nachgewiesen werden, führt eine Hämokonzentration zu einem proportionalen Anstieg der Werte. (Dennemann, 1961) Jedoch kann damit die Zunahme des ATP wahrscheinlich nur zu einem Teil erklärt werden.

4.4.2. 2,3,-Diphosphoglycerat

Die Konzentration des für eine erleichterte Sauerstoffabgabe in der periferen Zirkulation nötigen 2,3-DPG im Blut steigt nach der Verbrühung initial an und nimmt danach stetig, jedoch nicht unter den Anfangswert ab. Versuche an Ratten zeigen, daß nach 20 %-Verbrennung mit 250 °C und 100 °C die 2,3-DPG-Konzentration erst nach 36 bzw. 72 Stunden signifikant unter dem Kontrollbereich liegt. Der initiale Anstieg des 2,3-DPG nach Verbrennungen tritt auch hier auf (Domres, 1977) und ist zweifellos nicht nur im Sinne einer linear ansteigenden Hämokonzentration zu verstehen.

Die Versuchsdauer von 10 Stunden nach Verbrühung ist vermutlich zu kurz, um eine Verschlechterung der Sauerstoffabgabe an die Gewebe, d.h. eine Linksverschiebung der Sauerstoffdissoziationskurve zu bewirken.

4.5. Elektrolyte: Zink, Magnesium und Kupfer

4.5.1. Zink

Die bei Verbrennungsversuchen mit Ratten festgestellte initiale Erhöhung, gefolgt von einer progressiven Verminderung der Zinkkonzentration im Plasma (Dietrich et al., 1974; Domres et al., 1977; Mountokalakis et al., 1980) konnte in dieser Arbeit nicht beobachtet werden.

Der Zinkspiegel im Plasma der Kaninchen fällt schon kurz nach der Verbrühung ab, verglichen mit den Kontrolltieren besteht aber kein deutlicher Unterschied. Anhand der Kurvenverläufe zu Ende des Beobachtungszeitraumes besteht jedoch der Eindruck, daß bei den verbrühten Tieren der Zinkverlust pro Zeiteinheit größer ist.

Für eine verläßlichere Aussage über das Verhalten des Plasma-Zinks, insbesondere ob sich die fallende Tendenz bei den Versuchstieren noch fortsetzt, ist sicherlich eine längere Versuchsdauer als die gehandhabte nötig.

Wegen des Zinkverlustes nach Verbrennungen erscheint eine Substitution dieses Elektrolyts, gerade im Zusammenhang mit der Normalisierung der Wundheilung ratsam. (Dietrich et al., 1974)

4.5.2. Magnesium

Der Magnesiumspiegel im Plasma der verbrühten Kaninchen stieg wäh-

rend des Beobachtungszeitraums von 10 Stunden auf über das Doppelte.

Als Erklärung für diese Zunahme bietet sich die Zerstörung und Verkürzung der Lebensdauer von Erythrozyten an, wodurch das intrazellulär in höherer Konzentration vorhandene Magnesium freikommt.

Auch bei Ratten wurde dieser anfängliche Anstieg des Magnesiums nach Verbrennungen beobachtet. Nach der initialen Schockperiode folgte dann jedoch ein Mg-Mangelsyndrom. (Domres et al., 1977)

Aus dem Kurvenverlauf der Mg-Konzentration für die verbrühten Tiere in dieser Arbeit läßt sich noch kein Ende der Zunahme abschätzen. Mit der Entwicklung einer Hypomagnesämie kann in dieser relativ kurzen Zeit auch nicht gerechnet werden.

4.5.3. Kupfer

Bei den verbrühten Tieren kann, verglichen mit den Kontrollkaninchen, eine deutliche Abnahme der Kupferkonzentration im Plasma festgestellt werden. Dieser Abfall steht wahrscheinlich überwiegend im Zusammenhang mit dem gemessenen Rückgang der Albumin-Konzentration, da ca. 95 % des zirkulierenden Kupfers an Proteine gebunden ist. Der Kurvenverlauf des Plasma-Albumins entspricht in der Tendenz der Kurve für die Cu-Konzentration, auch wenn quantitativ bei der Cu-Bestimmung ein stärkerer Abfall resultiert.

Einige Autoren konnten bei Verbrennungspatienten weder eine im Serum, noch im Urin von den Normalwerten abweichende Kupferkonzentration nachweisen. (Cohen et al., 1973; Wood-Walker, 1974)

Im Urin von Kindern mit schweren Verbrennungen wurde jedoch eine deutliche und bis zu zwei Monaten anhaltende verstärkte Ausscheidung von Kupfer beobachtet. (Carr und Wilkinson, 1975)

Interessant ist in diesem Zusammenhang die Aktivitätsminderung des kupferhaltigen Enzyms Monoaminooxidase. Ob dabei ein Zusammenhang mit dem Abfall des proteingebundenen Kupfers im Blutstrom diskutiert werden muß, erscheint fragwürdig.

4.6. Plasmaproteine

4.6.1. Albumin

Der in dieser Arbeit bei den verbrühten Kaninchen festgestellte Verlust von 25 % des Plasmaalbumins in 10 Stunden bestätigt das erwartete

Verhalten dieses wichtigen Proteins.

Verbrennungspatienten entwickeln eine lang anhaltende Hypoalbuminämie (Ritzmann et al., 1973) , zugleich vermindert sich im Tierversuch der Albumingehalt in den nicht traumatisierten Geweben und Eingeweiden. (Fox et al., 1954) Dabei bleiben die Albuminwerte trotz Verabreichung großer Mengen von Plasma , Serum oder Albumin in den ersten 3 - 5 Tagen deutlich erniedrigt, da das Albumin im Verbrennungsgebiet wegen der zugenommenen Vasopermeabilität rasch den intravaskulären Raum verläßt und dort zu einer verstärkten Ödemneigung führt. (Leguit et al., 1973)

Von einer Infusion hyperonkotischen Albumins wird deshalb auch abgeraten , weil es die Hypovolämie und die Lungenödemneigung verstärkt. (Goodwin et al., 1981)

Neben dem verringerten kolloidosmotischen Druck des Blutes kann auch die beeinträchtigte Transportfunktion des Albumins zu klinischen Komplikationen führen ; z.B. : Hypocalcämie etc.. (Ritzmann et al.,1973)

4.6.2. Gamma-Globuline

Kurz nach Verbrennungen entwickelt sich eine Hypogammaglobulinämie , die möglicherweise neben der Verletzung der Hautbarriere und Störungen anderer immunologischer Systeme zu einem verminderten Widerstand gegen Infektionen beiträgt. (Leguit et al., 1973)

Auch bei den verbrühten Kaninchen zeigt sich eine Senkung des Gammaglobulinspiegels; und zwar um 30 % für die gesamte Gamma-Globulinfraktion in 10 Stunden. Das Ig M zeigt nach einem initialen Anstieg um 10 % einen Abfall um 20 % gegenüber dem Anfangswert.

Die kurzzeitige Ig M Zunahme und die darauffolgende langsame Abnahme sind wahrscheinlich auf das hohe Molekulargewicht dieses Antikörpers von 950000 zurückzuführen , weshalb er den intravaskulären Bereich kaum verlassen kann. (Arturson et al., 1969)

So könnte es wegen der Hypovolämie nach der Verbrennung zu einer kurzzeitigen, relativen Vermehrung des Ig M kommen, bevor Abbau und Verbrauch ihren Effekt zeigen.

Bei länger anhaltenden niedrigen Gammaglobulinspiegeln , wie sie vor allem bei Kindern nach Verbrennungen auftreten können, ist die intravenöse Zufuhr von Gamma - Globulinen angezeigt . (Ritzmann et al., 1969)

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Bestimmungsmethoden zur Messung einiger Blutparameter auf ihre Verwendbarkeit bei Kaninchen überprüft. In den experimentellen Untersuchungen wurden die in den ersten 10 Stunden nach einer standardisierten halbminütigen Verbrühung von 24 % der Körperoberfläche mit 90 °C heißem Wasser auftretenden Veränderungen der Parameter im Blut von 6 Versuchstieren gemessen und mit den Werten einer Kontrollgruppe von 3 Tieren verglichen. Die hämodynamischen Auswirkungen einer 2,5 stündlichen Blutentnahme von 8 ml wurden dabei bewußt nur teilweise durch physiologische NaCl-Lösung ersetzt, um den Schockmechanismus zu verstärken.

Bis auf die Bilirubinbestimmung lieferten alle Meßmethoden zufriedenstellende Resultate.

Nachfolgende Befunde wurden diskutiert; außer für Serotonin und Zink zeigten die Kontrolltiere keine nennenswerten Veränderungen.

Gesamtbilirubin: Gleichmäßige Zunahme um 70 %
Serotonin : Anstieg auf das Fünffache, nach 5 Stunden langsamer Abfall
Kontrolle: Kurzzeitiger, vergleichsweise geringer Anstieg
Monoaminooxidase: pH 6 und pH 8: 25 % bzw. 50 % Aktivitätsverlust
ATP : Zunahme um 45 %
ADP und AMP: Kurzzeitiger Anstieg um 40 % bzw. 30 %; nach 2,5 Stunden Abnahme, jedoch nicht unter den Anfangswert
2,3-DPG : Initiale Zunahme um 25 %, danach Rückkehr zum Anfangswert
Zink : Verlust von 30 %, jedoch kein nennenswerter Unterschied verglichen mit den Kontrolltieren
Magnesium : Gleichmäßige Zunahme um 100 %
Kupfer : Gleichmäßige Abnahme um 35 %
Albumin : Gleichmäßige Abnahme um 25 %
.-Globulin : Gleichmäßige Abnahme um 30 %
Ig M : Nach einem initialen Anstieg um 10 %, ein Verlust von 20 %

Bei der Bewertung der Ergebnisse wurden verbrühungsbedingte Veränderungen einzelner Parameter gegenüber reinen Hämokonzentrationseffekten klar abgegrenzt.

6. Tabellarischer Anhang

1. Gesamtbilirubin
2. Serotonin
3. Monoaminooxidase pH 6
4. Monoaminooxidase pH 8
5. Adenosin-5'-Triphosphat
6. Adenosin-5'-Diphosphat
7. Adenosin-5'-Monophosphat
8. 2,3-Diphosphoglycerat
9. Zink
10. Magnesium
11. Kupfer
12. Albumin
13. Gamma-Globulin
14. Ig M
15. Eichkurve Serotonin
16. Eichkurven Monoaminooxidase
17. Eichkurven Plasmaproteine

1. Gesamtbilirubin [mg/dl]

		Zeit in Stunden					
	Nr.	-0,5h	0,5 h	2,5 h	5,0 h	7,5 h	10,0h
Verbrühung	1	0,212	0,216	0,228	0,243	0,266	-
	2	0,230	0,234	0,284	0,297	0,338	0,338
	3	0,170	0,158	0,167	0,239	0,275	0,320
	4	0,216	0,261	0,320	0,324	0,360	0,360
	5	0,162	0,212	0,257	0,248	0,257	0,288
	6	0,185	0,216	0,320	0,405	0,383	0,320
Kontrolle	1	0,164	0,158	0,160	0,158	0,160	0,162
	2	0,203	0,203	0,196	0,189	0,221	0,230
	3	0,216	0,207	0,189	0,218	0,189	0,189

2. Serotonin [µg/ml]

		Zeit in Stunden					
	Nr.	-0,5h	0,5 h	2,5 h	5,0 h	7,5 h	10,0h
Verbrühung	1	0,193	0,634	0,980	1,473	0,913	-
	2	0,183	0,542	0,814	1,208	0,951	0,721
	3	0,218	0,609	0,702	0,801	1,284	0,913
	4	0,263	0,818	1,031	1,217	1,172	1,361
	5	0,292	0,407	0,759	0,798	0,618	0,516
	6	0,164	0,714	0,855	0,891	0,894	0,769
Kontrolle	1	0,167	0,193	0,170	0,250	0,218	0,180
	2	0,228	0,266	0,414	0,282	0,253	0,218
	3	0,164	0,305	0,580	0,196	0,209	0,215

3. Plasma-Monoaminooxidase pH 6 [U/l]

		Zeit in Stunden					
	Nr.	-0,5h	0,5 h	2,5 h	5,0 h	7,5 h	10,0h
Verbrühung	1	2,444	2,570	2,381	2,452	2,255	-
	2	2,027	2,027	1,751	1,798	1,656	1,680
	3	2,901	3,003	2,515	1,774	1,798	1,885
	4	3,303	3,350	3,216	3,571	3,114	2,641
	5	2,176	2,830	2,176	2,216	1,853	1,806
	6	3,445	3,177	3,216	3,185	2,673	2,255
Kontrolle	1	1,971	2,696	2,444	2,287	2,263	2,507
	2	3,807	4,028	3,665	4,083	3,689	4,161
	3	3,271	3,098	3,082	3,098	3,177	3,185

4. Plasma-Monoaminooxidase pH 8 [U/l]

		Zeit in Stunden					
	Nr.	-0,5h	0,5 h	2,5 h	5,0 h	7,5 h	10,0h
Verbrühung	1	2,394	2,441	2,744	2,521	1,637	-
	2	2,880	2,386	1,732	1,716	1,660	1,429
	3	1,740	1,756	1,294	1,278	1,119	1,007
	4	2,505	2,418	1,884	2,003	1,549	0,991
	5	2,481	2,457	1,868	1,772	1,342	1,222
	6	3,868	3,509	2,457	2,155	2,178	2,139
Kontrolle	1	1,358	1,063	1,095	1,158	0,911	1,182
	2	2,202	2,123	2,234	2,059	2,186	2,266
	3	1,525	1,501	1,501	1,501	1,541	1,565

5. Adenosin-5'-triphosphat [mg/dl]

		Zeit in Stunden					
	Nr.	-0,5h	0,5 h	2,5 h	5,0 h	7,5 h	10,0h
Verbrühung	1	38,06	40,61	48,68	56,25	52,81	-
	2	38,15	43,17	44,94	44,84	49,95	49,76
	3	32,06	41,99	40,51	38,45	42,19	47,50
	4	33,63	45,23	46,71	48,58	54,97	50,07
	5	31,76	36,38	36,88	38,06	39,14	39,33
	6	32,45	50,94	46,04	48,28	50,35	51,13
Kontrolle	1	38,06	36,97	40,61	41,01	43,56	43,07
	2	39,92	42,38	43,66	43,17	41,79	42,09
	3	34,12	36,97	35,11	36,09	36,38	33,53

6 Adenosin-5'-diphosphat [mg/dl]

		Zeit in Stunden					
	Nr.	-0,5h	0,5 h	2,5 h	5,0 h	7,5 h	10,0h
Verbrühung	1	3,225	3,615	3,540	3,820	4,185	-
	2	3,500	4,050	4,495	4,195	3,535	3,340
	3	3,765	4,600	4,965	4,300	4,405	4,795
	4	2,790	5,925	5,445	5,125	4,955	4,805
	5	2,825	2,675	4,130	3,855	3,100	3,500
	6	3,670	3,600	4,920	4,575	3,570	2,975
Kontrolle	1	3,190	2,755	3,445	3,235	3,365	3,180
	2	3,525	3,550	3,340	3,055	3,070	3,180
	3	3,365	3,500	2,790	3,035	2,405	3,430

7. Adenosin-5'-monophosphat [mg/dl]

		Zeit in Stunden					
	Nr.	-0,5h	0,5 h	2,5 h	5,0 h	7,5 h	10,0h
Verbrühung	1	0,338	0,324	0,319	0,333	0,399	-
	2	0,314	0,314	0,356	0,324	0,282	0,249
	3	0,338	0,324	0,399	0,338	0,338	0,366
	4	0,244	0,427	0,403	0,380	0,399	0,399
	5	0,253	0,244	0,366	0,305	0,253	0,296
	6	0,291	0,277	0,394	0,324	0,281	0,188
Kontrolle	1	0,361	0,300	0,338	0,314	0,319	0,357
	2	0,329	0,315	0,300	0,282	0,277	0,244
	3	0,300	0,300	0,281	0,282	0,221	0,267

8. 2,3-Diphosphoglycerat [µmol/ml]

		Zeit in Stunden					
	Nr.	-0,5h	0,5 h	2,5 h	5,0 h	7,5 h	10,0h
Verbrühung	1	3,69	4,70	4,26	4,95	4,32	-
	2	4,15	5,03	4,53	4,35	4,00	3,82
	3	3,30	4,11	3,77	3,39	3,46	3,50
	4	4,15	5,24	4,98	4,73	4,41	4,16
	5	3,10	3,92	4,01	3,64	3,49	3,26
	6	3,87	4,83	4,60	4,19	3,92	4,08
Kontrolle	1	3,91	3,83	4,23	3,74	3,72	4,02
	2	3,79	3,47	3,50	3,32	3,36	3,23
	3	4,27	4,26	4,12	3,91	3,94	3,79

9. Zink [µg/dl]

		Zeit in Stunden					
	Nr.	-0,5h	0,5 h	2,5 h	5,0 h	7,5 h	10,0h
Verbrühung	1	201	188	183	164	136	-
	2	154	164	188	148	98	75
	3	108	111	134	115	101	86
	4	160	144	161	159	124	143
	5	120	130	128	128	93	76
	6	98	101	130	119	84	54
Kontrolle	1	218	214	200	203	188	161
	2	120	118	144	124	126	129
	3	148	154	141	111	85	69

10. Magnesium [mmol/l]

		Zeit in Stunden					
	Nr.	-0,5h	0,5 h	2,5 h	5,0 h	7,5 h	10,0h
Verbrühung	1	1,10	1,17	1,29	1,50	1,99	-
	2	0,94	1,14	1,14	1,45	1,72	1,66
	3	0,91	1,13	1,62	1,58	1,82	2,41
	4	0,83	1,05	1,24	1,28	1,51	1,58
	5	1,19	1,29	1,62	1,72	1,91	2,19
	6	0,74	0,94	1,34	1,45	1,40	1,51
Kontrolle	1	1,05	0,87	1,14	0,97	1,04	1,14
	2	0,68	0,73	0,72	0,77	0,74	0,72
	3	0,90	0,85	0,77	1,02	1,16	1,05

11. Kupfer [µg/dl]

		Zeit in Stunden					
	Nr.	-0,5h	0,5 h	2,5 h	5,0 h	7,5 h	10,0h
Verbrühung	1	44,1	40,2	38,5	40,2	34,0	-
	2	75,3	56,4	57,5	53,0	51,3	51,9
	3	111,6	106,0	83,2	80,9	73,7	72,0
	4	87,6	83,2	78,1	68,6	59,7	64,2
	5	58,6	49,1	49,1	42,4	36,3	32,4
	6	78,1	67,0	59,7	53,0	45,8	50,2
Kontrolle	1	45,8	48,0	45,8	44,6	45,8	44,1
	2	65,9	64,2	61,9	60,3	60,8	62,5
	3	51,9	46,9	43,5	43,5	42,4	41,9

12. Albumin [mg/dl]

		Zeit in Stunden					
	Nr.	-0,5h	0,5 h	2,5 h	5,0 h	7,5 h	10,0h
Verbrühung	1	2609	2522	2279	2295	2157	-
	2	3040	2765	2190	2146	2223	2085
	3	2799	2586	2431	2138	2333	2317
	4	2610	2520	2282	2298	2262	2166
	5	2898	2757	2513	2448	2050	2027
	6	2797	2421	2363	2285	2127	2016
Kontrolle	1	2823	2838	2590	2526	2562	2735
	2	2844	2900	2707	2819	2702	2695
	3	2812	2692	2845	2607	2747	2620

13. Gamma-Globuline [mg/dl]

		Zeit in Stunden					
	Nr.	-0,5h	0,5 h	2,5 h	5,0 h	7,5 h	10,0h
Verbrühung	1	436	426	414	377	315	-
	2	542	614	479	426	454	455
	3	471	463	385	342	343	352
	4	529	484	437	456	410	376
	5	501	507	471	455	382	333
	6	421	348	358	322	293	279
Kontrolle	1	591	570	606	590	546	610
	2	428	428	435	386	421	413
	3	487	451	474	429	426	432

14. Ig M [mg/dl]

		Zeit in Stunden					
	Nr.	-0,5h	0,5 h	2,5 h	5,0 h	7,5 h	10,0h
Verbrühung	1	59,1	58,0	61,6	59,0	54,6	-
	2	45,9	51,3	48,2	43,7	42,4	39,4
	3	41,0	48,6	45,6	39,9	39,5	37,7
	4	39,4	42,9	41,9	36,8	30,7	30,1
	5	44,3	54,6	56,1	52,1	38,1	35,2
	6	43,5	50,0	46,2	40,2	34,1	28,4
Kontrolle	1	43,6	43,7	44,2	42,6	40,8	40,3
	2	40,5	38,4	39,2	37,8	36,3	37,3
	3	42,2	41,2	40,5	39,5	39,2	39,3

15. Eichkurve Serotonin [µg/ml]

Serotonin [µg/ml]	▲Fluoreszenzintensität
1,000	1,270
0,750	1,003
0,625	0,840
0,500	0,670
0,375	0,480
0,250	0,320
0,125	0,157
0,000	0,000

Korrelationskoeffizient r^2 = 0.998

16. Eichkurven Plasma-Monoaminooxidase

Benzaldehyd [nmol] im Probenvolumen (0,15 ml)	Extinktionen ΔE für pH 6	ΔE für pH 8
0	0,000	0,000
8	0,026	0,025
16	0,068	0,067
32	0,140	0,137
48	0,203	0,203
64	0,273	0,271
80	0,355	0,353
96	0,419	0,410
Korrelationskoeffizient	0,999 = r^2	0,999 = r^2

17. Eichkurven Plasmaproteine

	Standard [mg/dl]	Spannung U [V]	Abweichungen Δc
Albumin :	8,24	13,21	-0,39 %
	4,12	10,49	1,25 %
	2,06	5,20	-1,15 %
	1,03	1,73	0,08 %
	0,52	0,36	0,59 %
Gamma-	14,56	14,32	-0,24 %
Globulin:	7,28	11,26	0,88 %
	3,64	7,88	-0,71 %
	1,82	4,68	0,20 %
	0,91	2,38	-0,59 %
Ig M :	62,50	5,88	-0,17 %
	31,25	3,33	1,05 %
	15,63	1,74	-2,49 %
	7,81	1,04	3,23 %
	3,91	0,63	-2,18 %

7. Literaturverzeichnis

1. Arai, Y., Uesato, T., Sho, S., Kamijo, K.: Studies on monoaminooxidase; effects of pH on MAO in rabbit serum
   Japan. J. Pharmacol. 30, 928-930 (1980)
2. Arturson, G., Högman, C.F., Johansson, S.G.O., Killander, J.: Changes in immunoglobulin levels in severely burned patients
   Lancet I, 546-547 (1969)
3. Benesch, R., Benesch, R.E.: Intracellular organic phosphates as regulators of oxygen release by haemoglobin
   Nature 221, 618-622 (1969)
4. Bergmann, K.C., Wiesner, R.: Einsatz der Laser-Nephelometrie zur quantitativen Bestimmung von Ig A, Ig M, Ig G und anderer Serumproteine
   Dt. Gesundh.-Wesen 33, 855-857 (1978)
5. Bucher, D.: Das Verhalten der Adenosin-Phosphorsäuren und Plasmaproteine bei unterschiedlicher Infusionstherapie nach Verbrühungen
   Med. Dissertation, Universität Tübingen (1986)
6. Bücher, T.: Über ein phosphatübertragendes Gärungsferment
   Biochim. Biophys. Acta 1, 292-314 (1947)
7. Carr, G., Wilkinson, A.W.: Zinc and copper urinary excretions in children with burns and scalds
   Clin. Chim. Acta 61, 199-204 (1975)
8. Chanutin, A., Curnish, R.R.: Effect of organic and inorganic phosphates on the oxygen equilibrium of human erythrocytes
   Arch. Biochem. Biophys. 121, 96-102 (1967)
9. Cohen, I.K., Schechter, P.J.: Hypogeusia, anorexia, and altered zinc metabolism following thermal burn
   JAMA 223, 914-916 (1973)
10. Conrad, A., Schürmann, J., Kreutz, F.H.: Ausarbeitung einer Methode zur quantitativen Proteinbestimmung mit Hilfe eines Laser - Nephelometers im Routinelabor
    J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 16, 299-305 (1978)
11. Cope, O., Graham, J.B., Moore, F.D., Ball, M.R.: The nature of the shift of plasma protein to the extravascular space following thermal trauma
    Ann. Surg. 128, 1041-1055 (1948)
12. Dennemann, H.: Enzymatische Bestimmung von Adenosintriphosphat im Vollblut

Z. Ges. Exp. Med. 134, 335-340 (1961)

13. Dettmar, A.K.: Lichtstreuung und Teilchengrößenverteilung kugelförmiger Teilchen
Kolloid-Z. 188, 28-40 (1963)

14. Dietrich, F.E., Köhnlein, H.E., Kruse-Jarres, J.: Die Bedeutung von Zink bei der Heilung von Verbrennungswunden
Mschr. Unfallheilk. 77, 422-427 (1974)

15. Dietsch, P., Siegmund, P.: Über die Regulatorfunktion von 2,3-Diphosphoglycerat in Erythrocyten
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 15, 443 (1977)

16. Domres, B.: Veränderungen des Kohlenhydratstoffwechsels nach experimentellem Verbrennungstrauma
Med. Hab. Schr., Universität Tübingen (1977)

17. Domres, B., Heller, W., Koslowski, L., Schmidt, K.: Das Verhalten der Serumspiegel von Magnesium und Zink nach einem kontrollierten Verbrennungstrauma der Ratte
Langenbecks Arch. Chir. 343, 107-112 (1977)

18. Dorn, F., Günther, T.: Zur hormonalen Regulation des Zn-Stoffwechsels
Z. Klin. Chem. U. Klin. Biochem. 8, 618-620 (1970)

19. Fox, C.L., Lasker, S.E., Winfield, J.M., Mersheimer, W.L.: Albumin, potassium, sodium, and chloride redistribution and erythrocyte loss after surgical trauma and extensive burns
Ann. Surg. 140, 524-534 (1954)

20. Geißler, H.E., Mutschler, E.: Serotonin
Pharmazie in unserer Zeit 6, 54-59 (1977)

21. Gerst, P.H., Porter, M.R., Fishman, R.A.: Symptomatic magnesium deficiency in surgical patients
Ann. Surg. 159, 402-406 (1964)

22. Gonzales, G.F.: Blood levels of 5-hydroxytryptamine in human beings under several physiological situations
Life Sci. 27, 647-650 (1980)

23. Goodwin, C.W., Long, J.W., Mason, A.D., Pruitt, B.A.: Paradoxical effect of hyperoncotic albumin in acutely burned children
J. Trauma 21, 63-65 (1981)

24. Harris, R.L., Cottam, G.L., Johnston, J.M., Baxter, C.R.: The pathogenesis of abnormal erythrocyte morphology in burns
J. Trauma 21, 13-21 (1981)

25. Jaworek, D., Gruber, W., Bergmeyer, H.U. in Bergmeyer, H.U.: Methoden

der enzymatischen Analyse; 3. Aufl., Bd. II; Verlag Chemie, Weinheim, S 2178 (1974)

26. Jendrassik, L., Gróf, P.: Vereinfachte photometrische Methoden zur Bestimmung des Blutbilirubins
Biochem. Z. 297, 81-89 (1938)
27. Jope, R., Blass, J.P.: A comparison of the regulation of pyruvate dehydrogenase in mitochondria from rat brain and liver
Biochem. J. 150, 397-403 (1975)
28. Joseph, C.E., Ashrafi, S.H., Waterhouse, J.P.: Structural changes in rabbit oral epithelium caused by zinc deficiency
J. Nutr. III, 53-57 (1981)
29. Könn, G., Brandt, J.: Über die Todesursachen bei der Verbrennungskrankheit
Mschr. Unfallheilk. 77, 530-537 (1974)
30. Koslowski, L.: Zur Pathophysiologie und Allgemeinbehandlung schwerer Verbrennungen - neuere Einsichten und Erfahrungen
Chirurg 41, 385-390 (1970)
31. Koslowski, L.: Der Wandel der Infektion als Krankheitsfaktor und Todesursache nach Verbrennungen
Langenbecks Arch. Klin. Chir. 304, 672-675 (1963)
32. Leguit, P., Reerink - Brongers, E., Eijsvoogel , V.P.: Immunological studies in burn patients
Int. Arch. Allergy 44, 706-716 (1973)
33. Lewinsohn, R.: Human serum amine oxidase enzyme activity in severely burnt patients and in patients with cancer
Clin. Chim. Acta 81, 247-256 (1977)
34. Loebl, E.C., Baxter, C.R., Curreri, P.W.: The mechanism of erythrocyte destruction in the early post-burn period
Ann. Surg. 178, 681-686 (1973)
35. Loegering, D.J.: Haemolysis following thermal injury and depression of reticuloendothelial system phagocytic function
J. Trauma 21, 130-134 (1981)
36. Lowry, O.H., Passonneau, J.V., Hasselberger, F.X., Schulz, D.W.: effect of ischemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain
J. Biol. Chem. 239, 18-30 (1964)
37. Mc. Ewen, C.M., Cohen, J.D.: An amine oxidase in normal human serum
J. Lab. Clin. Med. 62, 766-776 (1963)

38. Mc. Ewen, C.M.: Human plasma monoamine oxidase; I. Purification and identification
J. Biol. Chem. 240, 2003-2010 (1965)
39. Mc. Ewen, C.M.: Human plasma monoamine oxidase; II. Kinetic studies
J. Biol. Chem. 240, 2011-2018 (1965)
40. Mc. Ewen, C.M., Cullen, K.T., Sober, A.J.: Rabbit serum monoamine oxidase
J. Biol. Chem. 241, 4544-4556 (1966)
41. Mc. Ewen, C.M., Castell, D.O.: Abnormalities of serum monoamine oxidase in chronic liver disease
J. Lab. Clin. Med. 70, 36-47 (1967)
42. Mehrkens, H.H.: Initialer Flüssigkeits- und Volumenersatz mit kolloidfreien und kolloidhaltigen Elektrolytlösungen nach standardisiertem Verbrennungstrauma
Med. Hab. Schr., Universität Ulm (1979)
43. Miller, C.L.: Burns and the immune network
J. Trauma 19, 880-883 (1979)
44. Mountokalakis, T., Voyatzoglou, V., Boukis, D., Tsata - Voyatzoglou, V., Koutselinis, A., Merikas, G.: Differential effect of surgical injury and thermal burn on zinc metabolism in man
Klin. Wochenschr. 58, 695-697 (1980)
45. Nielsen, S.P., Jemec, B.: Zinc metabolism in patients with extensive burns
Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. 2, 47-52 (1968)
46. Oberleas, D., Seymour, J.K., Lenaghan, R., Hovanesian, J., Wilson, R.F., Prasad, A.S.: Effect of zinc deficiency on wound healing in rats
Am. J. Surg. 121, 566-568 (1971)
47. Perutz, M.F.: Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin
Nature 228, 726-732 (1970)
48. Petrides, P.E., Löffler, G., Weiss, L. in Löffler, G.: Physiologische Chemie; 2. Aufl.; Springer-Verlag, Berlin (1979)
49. Pruitt, B.A., Tumbusch, W.T., Mason, A.D., Pearson, E.: Mortality in 1100 consecutive burns treated at a burns unit
Ann. Surg. 159, 396-397 (1964)
50. Quadflieg, K.H., Brand, K.: Energy metabolism of various substrates and the 2,3-biphosphoglycerate bypass in human erythrocytes
Eur. J. Biochem. 82, 523-528 (1978)
51. Quarantillo, E.P.: Effect of supplemental zinc on wound healing in

rats
Am. J. Surg. 121, 661-664 (1971)

52. Rapoport, S., Guest, G.M.: Distribution of acid-soluble phosphorus in the blood cells of various vertebrates
J. Biol. Chem. 138, 269-282 (1941)

53. Rose, Z.B.: The enzymology of 2,3-biphosphoglycerate
Adv. Enzymol. 51, 211-249 (1980)

54. Ricketts, C.R.: Molecular permeability of the burned area
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 121, 770-772 (1966)

55. Ritzmann, S.E., Larson, D.L., Mc Clung, C., Abston, S., Falls, D., Goldman, A.S.: Immunoglobulin levels in burned patients
Lancet I, 1152-1153 (1969)

56. Ritzmann, S.E., Daniels, J.C., Larson, D.L.: Diagnostic interpretation of serum protein abnormalities in thermal burns
A. J. C. P. 59, 135-144 (1973)

57. Sanders, R.: The burnt patient: A general view
B. Med. J. 59, 460-463 (1974)

58. Sandstead, H.H., Lanier, V.C., Shephard, G.H., Gillespie, D.D.: Zinc and wound healing
Am. J. Clin. Nutr. 23, 514-519 (1970)

59. Saur, K., Schlosser, D., Schweiberer, L.: Pathophysiologie und Therapie der Verbrennungen
Deutsches Ärztebl. 73, 1081-1088 (1976)

60. Saxena, P.R., Forsyth, R.P., Johnston, B.M., De Werk, A.: Regional and systemic haemodynamic changes evoked by 5-hydroxytryptamine in awake and anaesthetized rabbits
Eur. J. Pharm. 50, 61-68 (1978)

61. Schumer, W., Kukral, J.C.: Metabolism of shock
Surgery 63, 630-636 (1968)

62. Sevitt, S.: A review of the complications of burns, their origin and importance for illness and death
J. Trauma 19, 358-369 (1979)

63. Sieber, A.: Proteinbestimmung durch Laser-Nephelometrie
Laboratoriumsblätter Behringwerke AG. 26, 117-123 (1976)

64. Sieber. A.: Bestimmung von Proteinen mit Hilfe der Laser-Nephelometrie
Krankenhausarzt 52, 858-862 (1979)

65. Sitzius, F.: Atom-Absorptions-Spektroskopie in der Arzneimittelkontr.
Pharmazie in unserer Zeit 6, 8-13 (1977)

66. Snyder, S.H., Axelrod, J., Zweig, M.: A sensitive and specific fluorescence assay for tissue serotonin
Biochem. Pharmac. 14, 831-835 (1965)
67. Willis, J.B.: Determination of calcium and magnesium in urine by atomic absorption spectroscopy
Anal. Chem. 33, 556-559 (1961)
68. Wood-Walker, R.B.: Zinc and copper in serum and urine of children with burns
S. Afr. Med. J. 48, 1495-1496 (1974)
69. Yamada, H., Yasunobu, K.T.: Monoamine oxidase
J. Biol. Chem. 237, 1511-1516 (1962)
70. Yamada, H., Yasunobu, K.T.: Monoamine oxidase
J. Biol. Chem. 237, 3077-3082 (1962)

Lebenslauf: Jan-Willem Krüger

04. 08. 1951: geboren in Enschede (Niederlande)
01. 04. 1958: aufgenommen in die Bürgerschule 4 in Lemgo
11. 05. 1971: Abitur am Engelbert-Kämpfer-Gymnasium in Lemgo
04. 10. 1971 - 31. 10. 1972: Wehrdienst
01. 03. 1973 - 25. 08. 1973: Praktikum im Dentallabor in Lemgo
15. 10. 1973 - 05. 05. 1976: Studium der Forstwissenschaft in Göttingen
06. 10. 1975: Vordiplom der Forstwissenschaft
16. 09. 1976 - 16. 04. 1982: Studium der Zahnmedizin in Groningen (Niederlande)
16. 04. 1982: zahnmedizinisches Staatsexamen in Groningen
01. 08. 1982: Doktorand an der Chirurgischen Klinik in Tübingen
01. 05. 1983: Beginn der zahnärztlichen Tätigkeit in Lemgo

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45